

**Der Einfluss des Ca^{2+} -aktivierten K^{+} -Kanals KCa3.1
und spannungsunabhängiger Ca^{2+} -Kanäle
auf die Ca^{2+} -Homöostase in humanen Melanomzellen.**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades „doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Dipl.-Biochemikerin Kristin Friebe

geboren am 09.12.1983 in Leipzig

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan H. Heineman (Institut für Biochemie und Biophysik, Jena)
2. Gutachter: Prof. Dr. Frank-Dietmar Böhmer (Institut für Molekulare Zellbiologie, Jena)
3. Gutachter: Prof. Dr. Tim D. Plant (Pharmakologisches Institut, Marburg)

Datum der Verteidigung: 29.09.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Zelluläre Ca^{2+} -Homöostase	1
1.2 Ionenkanäle	4
1.2.1 TRP-Kanäle	4
1.2.2 CRAC-Kanäle	5
1.2.3 Kaliumkanäle	7
1.2.4 Der KCa3.1 -Kanal und die KCa -Familie	9
1.3 Ca^{2+} -Homöostase und Krebs	11
1.4 K^{+} -Kanäle und Krebs	13
1.5 Melanom und Therapiemöglichkeiten	14
1.6 Relevante Vorarbeiten der Arbeitsgruppe	17
1.7 Zielstellung der Arbeit	19
2 Methoden	21
2.1 Lösungen und Chemikalien	21
2.2 Zellkultur	21
2.2.1 Kulturmedien, Puffer und Chemikalien für Zellkulturarbeiten	21
2.2.2 Zelllinien	22
2.2.3 Kultivierung der Zelllinien	22
2.2.4 Transiente Transfektion	23
2.2.5 Proliferationsassay (MTT-Assay)	24
2.2.6 Migrationsassays	24
2.2.7 Bestimmung der Cytotoxizität verwendeter Substanzen (LDH-Assay)	25
2.3 Molekularbiologische Methoden	25
2.3.1 Material für molekularbiologische Methoden	26

2.3.2 Erzeugung der dominant-negativen KCa3.1-Mutanten	26
2.3.3 Quantitative <i>real-time</i> PCR	27
2.4 Elektrophysiologische Methoden	28
2.4.1 Lösungen und Chemikalien für elektrophysiologische Messungen	28
2.4.2 Patch-Clamp-Messungen in der Ganzzellkonfiguration	29
2.4.3 Bestimmung des IC ₅₀ -Wertes des KCa3.1-Inhibitors TRAM-34 in HEK 293-Zellen	30
2.5 Calcium-Imaging-Methode	32
2.5.1 Lösungen und Chemikalien für das Calcium-Imaging	32
2.5.2 Messprinzip der Calcium-Imaging-Methode mit Fura-2	32
2.5.3 Beladung der Zellen mit Fura-2 AM und Ca ²⁺ -Messungen an Zellen	33
2.5.4 Kalibrierung	34
2.6 Statistik	35
3 Ergebnisse	36
3.1 Elektrophysiologische Untersuchungen zum Nachweis von KCa3.1 in Melanomzellen	36
3.1.1 KCa3.1-Ströme in Melanomzelllinien	36
3.1.2 Vergleich von KCa3.1-Expression und Stromdichte	38
3.1.3 Einfluss des KCa3.1-Inhibitors TRAM-34 auf die MIA-Sekretion in Melanomzellen	40
3.1.4 Erzeugung und Validierung von dominant-negativen Expressionskonstrukten des KCa3.1-Kanals	42
3.1.5 Einsatz der dominant-negativen KCa3.1-Kanalmutanten zur Unterdrückung der KCa3.1-Leitfähigkeit in Melanomzellen	45
3.2 Ca ²⁺ -Homöostase und Ca ²⁺ -Kanäle in Melanomzellen	47
3.2.1 Einfluss von KCa3.1 auf den Ca ²⁺ -Haushalt in ruhenden Melanomzellen	47
3.2.2 CRAC-Kanäle in Melanomzellen	50
3.2.3 Einfluss von KCa3.1 auf SOCE	54
3.2.4 TRP-Kanäle in Melanomzellen	58
3.2.5 Untersuchung von Melanomzellen auf endogene Aktivität von TRPV1	60

3.2.6 Untersuchung von Melanomzellen auf endogene Aktivität von TRPV2	61
3.2.7 Untersuchung von Melanomzellen auf endogene Aktivität von TRPV4	62
3.2.6 KCa3.1 und TRPV4	70
3.3 Einfluss des TRPV4-Blockers HC-047067 auf die Proliferation und Migration von Melanomzellen	71
4 Diskussion	75
4.1 Ca ²⁺ -Kanäle in Melanomlinien	75
4.1.1 CRAC-Kanäle in Melanomlinien	75
4.1.2 TRP-Kanäle in Melanomlinien	78
4.2 Einfluss von TRPV4 auf die Proliferation und Migration von Melanomzellen	81
4.3 Einfluss von KCa3.1 auf Ca ²⁺ -Homöostase im Melanom	83
4.3.1 Expression von KCa3.1 in Melanomlinien	83
4.3.2 Der Einfluss von KCa3.1 auf die Zellmigration, Proteinsekretion und Zellproliferation	85
4.3.3 KCa3.1 Einfluss auf Ca ²⁺ -Einstrom	88
4.4 KCa3.1 und TRPV4 als mögliche Kandidaten in der Melanomtherapie	91
5 Zusammenfassung	94
Summary	96
6 Literaturverzeichnis	98
Danksagung	112
Ehrenwörtliche Erklärung	114
Publikationstätigkeit	115

Abkürzungsverzeichnis

AU	<i>arbitrary units</i>
CaM	Calmodulin
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CRAC	<i>calcium release-activated calcium</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor, <i>G protein-coupled receptor</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEDTA	N-(2-Hydroxyethyl)-ethylendiamin-N,N,N'-triessigsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SERCA	<i>sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase</i>
SOCE	<i>store-operated calcium entry</i>
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TG	Thapsigargin
TM	Transmembransegmente
TRP	<i>transient receptor potential</i>

1 Einleitung

Der menschliche Körper enthält etwa 1 kg Calcium, welches damit das häufigste Mineral im Organismus ist. Von dieser Gesamtmenge sind aber etwa 99% im Knochengerüst in Form von Calciumphosphat oder Calciumsulfat gebunden und in dieser Form biologisch nicht mehr frei verfügbar. Neben dieser Funktion als Grundbaustein der Knochensubstanz stellen freie Calciumionen (Ca^{2+}) die biologisch aktive Form dieses Minerals dar. Ca^{2+} wirken als intrazelluläres Signal und die Konzentration der freien Ca^{2+} ist als wichtiger Drehpunkt in eine Vielzahl zellulärer Funktionen und physiologischer Prozesse eingebunden. Von der Entstehung neuen Lebens bei der Befruchtung der Eizelle bis hin zum Tod von Zellen und des gesamten Organismus spielt Ca^{2+} eine bedeutende Rolle als sekundärer Botenstoff (*second messenger*). Es reguliert physiologische Prozesse wie Gentranskription, Zellproliferation, Zellmigration, Sekretion oder Apoptose, und ist auch entscheidend an der Muskelkontraktion und am Sehprozess beteiligt (Berridge et al., 2003; Clapham, 2007).

Fehlregulationen von Ca^{2+} -abhängigen Mechanismen können die genannten physiologischen Prozesse beeinflussen, sie führen aber mitunter auch zu proliferativen Erkrankungen wie Krebs. Störungen des Zellzyklus und der Apoptose können Tumorbildung und -wachstum fördern. Zudem ist die Zellmotilität entscheidend für Tumordinvasion und Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2011). Ionenkanäle und Pumpen, die die Ca^{2+} -Homöostase kontrollieren, zeigen veränderte Expression in Krebszellen und rücken zunehmend in den Fokus bei der Suche nach neuen Zielmolekülen in der Krebstherapie (Monteith et al., 2007).

1.1 Zelluläre Ca^{2+} -Homöostase

Im Allgemeinen beruht die Signalfunktion von Ca^{2+} auf einem Anstieg der freien Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol, wo Ca^{2+} an verschiedenste Effektormoleküle binden können. Eine extrem schnelle Erhöhung dieser intrazellulären Konzentration wird dadurch möglich, dass aktive Transportprozesse in jeder lebenden Zelle einen starken Konzentrationsgradienten ($> 20\,000$ -fach) zwischen dem extrazellulären Raum und dem Cytosol erzeugen. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in ruhenden Zellen beträgt nur etwa 100 nM und wird strikt reguliert. (Clapham, 2007). Um diese niedrige Ca^{2+} -Konzentration zu erreichen, existieren spezielle Speicherorganellen innerhalb der Zellen und Transportmechanismen, die Ca^{2+} aus dem Cytosol entfernen (Abb. 1-1). ATP-getriebene Pumpen und verschiedene Antiporter schaffen Ca^{2+} aus dem Cytosol in den extrazellulären Raum oder in Speicherorganellen wie das endoplasmatische oder sarkoplasmatische Retikulum (ER/SR) und die Mitochondrien. Die *plasma membrane Ca^{2+} -ATPase* (PMCA) pumpt Ca^{2+} unter ATP-Verbrauch über die Plasmamembran nach außen und

die *sarco(endo)plasmic reticulum* Ca^{2+} -ATPase (SERCA) ins ER/SR. Weiterhin existieren $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ -Austauscher (NCKX), die als Antiporter bestehende Ionengradienten für Na^+ und K^+ nutzen, um Ca^{2+} über die Plasmamembran nach außen zu befördern (Berridge et al., 2003). Mithilfe des erst kürzlich entdeckten *mitochondrial calcium uniporter* (MCU) können zudem große Mengen Ca^{2+} in Mitochondrien transportiert werden. Der elektrogene Transport von Ca^{2+} wird durch die Elektronentransportkette der Mitochondrien ermöglicht, welche eine Hyperpolarisation der inneren Mitochondrienmembran erzeugt. (Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011).

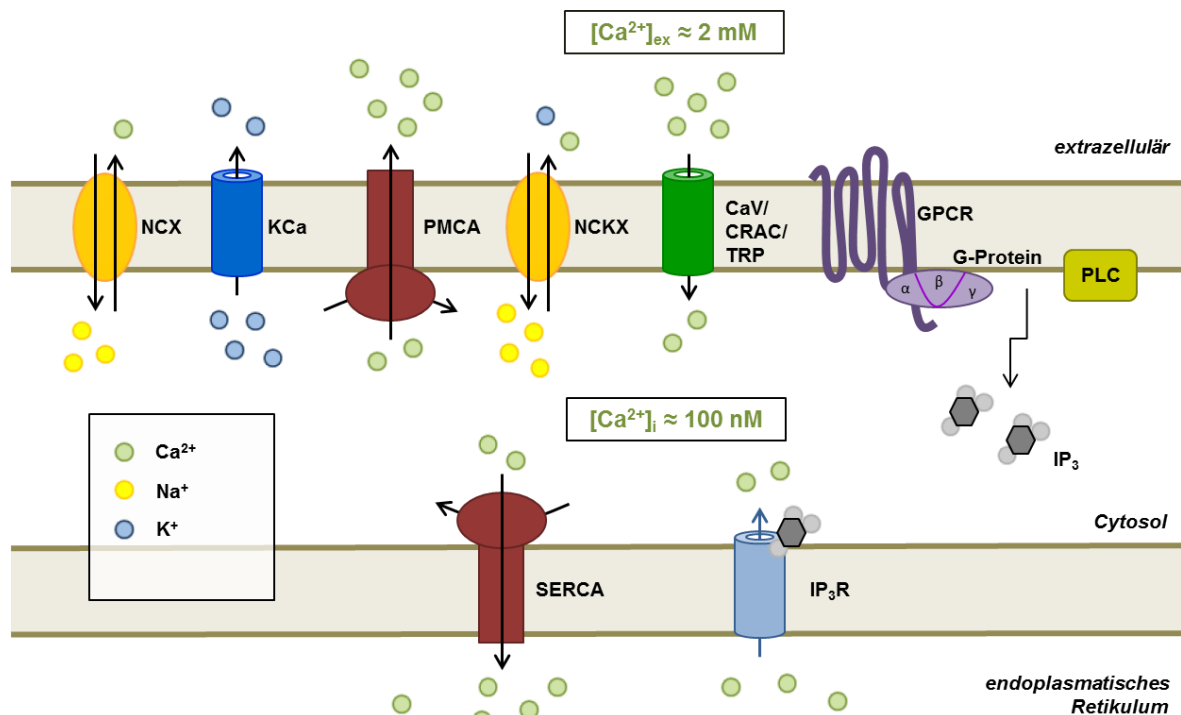


Abbildung 1-1: Regulation der zellulären Ca^{2+} -Homöostase – schematische Darstellung einiger ausgewählter Membranproteine. Zur Aufrechterhaltung des großen Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten zwischen dem extrazellulären Raum ($\approx 2 \text{ mM}$) und dem Cytosol ($\approx 100 \text{ nM}$) existieren verschiedene Transporter, die dafür sorgen, dass $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ in ruhenden Zellen niedrig bleibt. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ -Austauscher (NCKX) und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) nutzen bestehende Na^+/K^+ -Gradienten für den Ca^{2+} -Transport aus der Zelle. Die beiden Pumpen PMCA (*Plasma-Membran* Ca^{2+} -ATPase) und SERCA (*sarco(endo)plasmic reticulum* Ca^{2+} -ATPase) transportieren aktiv Ca^{2+} vom Cytosol aus der Zelle beziehungsweise in das endoplasmatische Retikulum (ER). Eine Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ kann durch Ca^{2+} -Einstrom von außen über spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle (CaV) sowie TRP-Kanäle oder durch Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) erfolgen. Letzteres führt zur Bildung von IP_3 durch Phospholipase C (PLC), welches an IP_3 -Rezeptoren (IP_3R) bindet und schließlich die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER ins Cytosol bewirkt. Durch Entleerung der Ca^{2+} -Speicher wird zudem SOCE (*store-operated* Ca^{2+} entry) aktiviert und Ca^{2+} strömt über CRAC-Kanäle (*Ca²⁺ release-activated* Ca^{2+} channels) der Plasmamembran in die Zelle (modifiziert nach Clapham, 2007).

Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann im Wesentlichen über zwei Wege erfolgen, durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern und durch Einstrom über die Plasmamembran. Von außen kann Ca^{2+} über spannungsabhängige Kanäle (CaV) oder durch ligandengesteuerte Ca^{2+} -Kanäle wie NMDA- oder ATP-Rezeptoren einströmen. CaV-Kanäle

ermöglichen einen sehr schnellen und starken Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration um etwa das zehnfache innerhalb weniger Millisekunden. Dies ist wichtig für schnelle zelluläre Prozesse wie die Muskelkontraktion oder die Exozytose von Transmittern an synaptischen Enden von Nervenzellen. Ca^{2+} -Einstrom kann auch über sogenannte TRP-Kanäle (*transient receptor potential*) erfolgen. Diese meist weniger selektiven Kationenkanäle besitzen eine niedrige Ca^{2+} -Leitfähigkeit und agieren über längere Zeit ohne die Zelle mit übermäßigen Mengen Ca^{2+} zu überschwemmen. Sie wirken daher auch eher bei langsameren Prozessen wie der Zellproliferation oder der Kontraktion der glatten Muskulatur (Berridge et al., 2003).

Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern geschieht vor allem über zwei ligandenabhängige Ca^{2+} -Kanäle, den IP_3 -Rezeptor und den Ryanodin-Rezeptor (RyR) in der Membran des ER beziehungsweise des SR. Gesteuert wird dies durch die *second messenger* 1,4,5-Inositoltriphosphat (IP_3), cADPR (*cyclic ADP ribose*) und NAADP (*nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate*) sowie auch durch Ca^{2+} selbst. Die Bildung von IP_3 erfolgt intrazellulär durch verschiedene Isoformen der Phospholipase C (PLC). PLC kann über verschiedene Mechanismen aktiviert werden. Dazu gehören Signalwege über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G protein-coupled receptor*, GPCR), über Tyrosinkinase-gekoppelte Rezeptoren und über das Protein Ras, aber auch ein intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg selbst kann PLC-Aktivierung auslösen. Die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER führt zu einem transienten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bis zu $1\ \mu\text{M}$ für einige Sekunden (Berridge, 2009). Da die Pumpe PMCA Ca^{2+} schneller aus der Zelle befördert, als die Speicher wieder aufgefüllt werden, kommt es zu einer Entleerung des ER. Dies aktiviert einen Mechanismus, welcher als *store-operated Ca^{2+} entry* (SOCE) bezeichnet wird (Putney, 2005) und einen Ca^{2+} -Einstrom von außen über *Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels* beziehungsweise CRAC-Kanäle bewirkt (Parekh und Penner, 1997).

Sowohl im Cytosol als auch in den Organellen wie ER/SR und Mitochondrien, gibt es Ca^{2+} -bindende Moleküle, die als Ca^{2+} -Puffer fungieren. Ca^{2+} werden dadurch effizienter im endoplasmatischen oder sarkoplasmatischen Retikulum sowie in Mitochondrien gespeichert. Im ER werden Ca^{2+} an das Ca^{2+} -bindende Protein Calreticulin gebunden, welches Ca^{2+} als Antwort auf zelluläre Signale freisetzen kann. In Muskelzellen wird Ca^{2+} an Calsequestrin des SR gebunden und bei neuronalen Stimuli freigesetzt, was zur Muskelkontraktion führt. Im Cytosol wird Ca^{2+} unter anderem an Calretinin oder Parvalbumin gebunden. Da die Ca^{2+} -Puffer über unterschiedliche Bindungskinetiken und Affinitäten verfügen, können sie die Ca^{2+} -Signale räumlich und zeitlich feinabstimmen (Berridge et al., 2003). Weitere Ca^{2+} -bindende Proteine fungieren als Effektormoleküle wie zum Beispiel Calmodulin (CaM), S100-Proteine und Synaptotagmin, welche nachgeschaltete Zielmoleküle wie CaM-Kinase (CaMK), Proteinkinase C (PKC) oder

Transkriptionsfaktoren aktivieren und entsprechende Ca^{2+} -abhängige Prozesse wie Proliferation oder Vesikelfusion auslösen (Berridge et al., 2003).

Im Vergleich zur niedrigen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Cytosol ist die Ca^{2+} -Konzentration extrazellulär mit 1 mM bis 2 mM sehr hoch. Dieser starke Konzentrationsunterschied liefert ideale Bedingungen für Ca^{2+} als sekundären Botenstoff, so dass auch kurze Kanalöffnungen (*bursts*) schon sehr starke Signale erzeugen können. Während vieler Signalprozesse steigt die Ca^{2+} -Konzentration etwa zehnfach an. Ein länger anhaltender oder stärkerer Anstieg kann jedoch toxisch für Zellen sein und führt häufig zu Apoptose.

Viele Prozesse und Zellkomponenten sind in die Regulation der Ca^{2+} -Homöostase der Zelle eingebunden und erlauben der Zelle die Form von Ca^{2+} -Signalen zu gestalten, das heißt sie in Bezug auf Ort, Zeit und Amplitude zu variieren. Je nach Ausstattung der Zelle mit den verschiedenen Isoformen von Ca^{2+} -Pumpen, Transportern und Ionenkanälen lassen sich die Ca^{2+} -Signale ihrer physiologischen Aufgabe entsprechend formen.

Im Folgenden werden diejenigen Ionenkanäle näher betrachtet, die für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung waren.

1.2 Ionenkanäle

Ionenkanäle ermöglichen den kontrollierten Stoffaustausch über die Zellmembran und zwischen Cytosol und Zellorganellen. Es sind integrale Membranproteine, die eine Pore bilden und Ionen passiv, das heißt entlang dem elektrochemischen Gradienten transportieren. Am besten bekannt ist ihre Funktion für die Aufrechterhaltung und Regulation des Membranpotentials und für die Signalweiterleitung in erregbaren Zellen des Nervensystems oder in Muskelzellen. Aber auch in nicht-erregbaren Zellen regulieren Ionenkanäle zahlreiche physiologische Prozesse wie Sekretion von Hormonen und Transmitterstoffen, Änderung des Zellvolumens, sowie Migration und Zellproliferation.

Anhand der Selektivität der Kanalpore für bestimmte Ionen unterscheidet man beispielsweise Natrium (Na^+)-, Kalium (K^+)-, Calcium- (Ca^{2+}) und Chlorid (Cl^-)-Kanäle. Darüber hinaus gibt es auch unspezifische Kationenkanäle wie TRP-Kanäle, die Leitfähigkeit für K^+ , Na^+ und Ca^{2+} besitzen.

1.2.1 TRP-Kanäle

Die TRP (*transient receptor potential*)-Superfamilie besteht aus einer großen Zahl an Kanalproteinen, welche sich hinsichtlich ihrer Funktion, Struktur, Aktivierungsmechanismen und

Selektivität für Kationen unterscheiden. TRP-Kanäle sind sowohl in Vertebraten wie Mäusen und Menschen als auch in Invertebraten wie Würmern und Fruchtfliegen zu finden. Anhand ihrer Struktur unterscheidet man sieben Unterfamilien: TRPC (Canonical), TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastatin), TRPP (Polycystin), TRPML (Mucolipin), TRPA (Ankyrin) und TRPN (*no mechanoreceptor potential C*). In Säugetieren gibt es sechs dieser Unterfamilien mit bisher 28 Mitgliedern; TRPN ist hier nicht vertreten (Venkatachalam und Montell, 2007; Vriens et al., 2009). Allen TRP-Kanälen gemeinsam ist, dass die Untereinheiten sechs Transmembransegmente (TM) und eine Porenschleife zwischen TM5 und TM6 enthalten. Relativ große cytoplasmatische Domänen mit teilweise regulatorischer Funktion finden sich im N- und C-Terminus. Diese TRP-Untereinheiten bilden Homo- und Heterotetramere mit einer zentralen Pore, jedoch ist noch nicht viel bekannt über ihre Permeations- und Poreneigenschaften. Alle TRP-Kanäle sind für Kationen durchlässig, nur TRPM4 und TRPM5 sind nicht für Ca^{2+} , TRPV5 und TRPV6 sind hingegen besonders gut für Ca^{2+} permeabel (Owsianik et al., 2006). TRP-Kanäle sind vor allem in sensorische Prozesse wie Sehen und Hören, Geschmacks-, Tast- und Geruchssinn involviert und sie stellen wichtige Thermo- und Osmosensoren dar (Venkatachalam und Montell, 2007).

1.2.2 CRAC-Kanäle

Induzierter Ca^{2+} -Einstrom nach Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher dient zum Wiederauffüllen der Speicher und erfolgt über sogenannte *store-operated channels* (SOC). Der Vorgang wird allgemein als *store-operated Ca^{2+} entry* (SOCE) bezeichnet. Die so aktivierten Ströme wurden bereits 1986 von Putney biophysikalisch charakterisiert (Putney, 1986; Putney, 1990). Experimentell lassen sich verschiedene Typen des SOCE unterscheiden. Am besten charakterisiert ist dabei der sogenannte *Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current* (I_{CRAC}) (Hoth und Penner, 1992). Die molekularen Komponenten der zugrunde liegenden CRAC (*Ca^{2+} release-activated Ca^{2+}*)-Kanäle konnten allerdings erst viel später identifiziert werden (Liou et al., 2005; Zhang et al., 2005; Feske et al., 2006; Prakriya et al., 2006; Yeromin et al., 2006). Sie bestehen aus porenbildenden Untereinheiten in der Plasmamembran (ORAI) und in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) sitzenden Ca^{2+} -Sensorproteinen, die als STIM (*stromal interaction molecule*) bezeichnet werden. Es gibt drei Isoformen von ORAI: ORAI1, ORAI2 und ORAI3, die Homo- oder Heterotetramere bilden können. Jede ORAI-Untereinheit besitzt vier Transmembrandomänen sowie cytosolische N- und C-Termini. Für STIM codieren zwei verwandte Gene: *STIM1* und *STIM2*. Stim-Proteine verfügen unter anderem über eine Transmembrandomäne und eine Region im C-Terminus, die CAD (*CRAC activation domain*), die mit ORAI-Proteinen wechselwirkt. Der eigentliche Ca^{2+} -Sensor im STIM-Protein besteht aus einer N-terminalen EF-Hand, die ins ER-Lumen reicht (Jairaman und Prakriya, 2013). In Abbildung 1-2 ist

schematisch die Topologie von ORAI1 und STIM1 sowie die Interaktion über ihre CAD-Domänen dargestellt. CRAC-Kanäle sind spannungsunabhängig, einwärts gleichrichtend und verfügen über eine geringe Leitfähigkeit (Zweifach und Lewis, 1993; Parekh und Penner, 1997). Ihre Selektivität für Ca^{2+} ist unter physiologischen Bedingungen mit einer mehr als tausendmal größeren Permeabilität als für Na^{+} sehr hoch (Hoth und Penner, 1993).

Nach Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher kommt es zur Bildung von STIM-Multimeren in der ER-Membran, welche anschließend zu Bereichen der ER-Membran wandern, die sie in räumliche Nähe von ORAI-Untereinheiten der Plasmamembran bringen und diese über Kontakt zu cytoplasmatischen Regionen aktivieren (Penna et al., 2008).

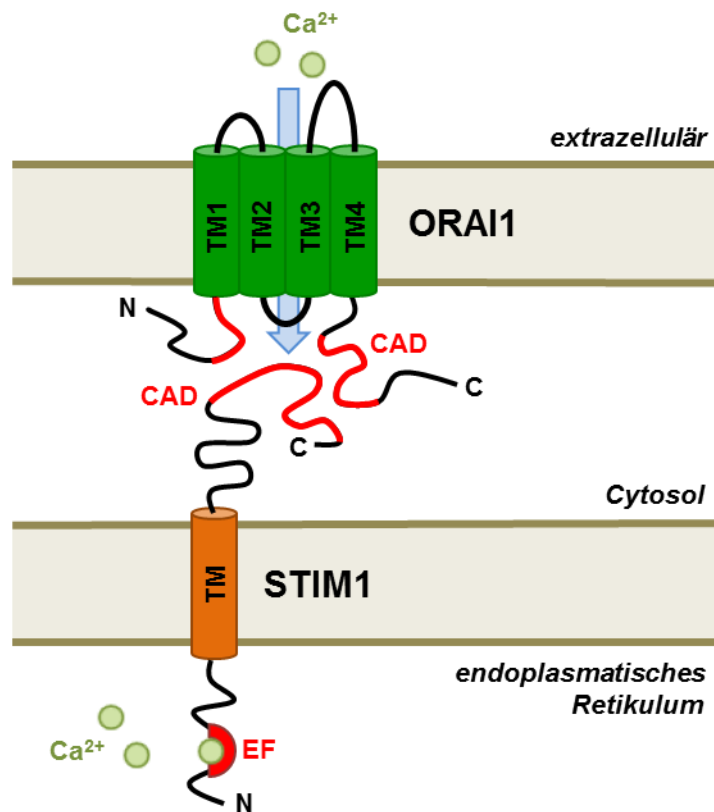


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Interaktion von ORAI1 und STIM1 sowie deren Topologie. Der Einfachheit halber ist jeweils nur eine Untereinheit dargestellt. Die porenbildende Untereinheit ORAI1 befindet sich in der Plasmamembran und besteht aus vier Transmembransegmenten (TM) sowie cytosolischen N- und C-Termini. Das Ca^{2+} -Sensorprotein STIM1 ist in der Membran des ER lokalisiert und bindet Ca^{2+} über eine EF-Hand im N-Terminus. Nach Ca^{2+} -Bindung wandert STIM1 zu Bereichen im ER nahe der Plasmamembran, wo ORAI- und STIM-Proteine über ihre CAD-Domänen (*CRAC activation domain*, rot markiert) wechselwirken und ORAI1 aktiviert wird. Dies führt schließlich zum Ca^{2+} -Einstrom (blauer Pfeil) über ORAI1 (modifiziert nach Jairaman und Prakriya, 2013).

CRAC-Kanäle sind in Zellen der glatten Muskulatur von Blutgefäßen, Skelettmuskulatur, Melanozyten, und Endothelzellen zu finden. Sie übernehmen hier wichtige Funktionen wie Genexpression, Sekretion und Zellwachstum (Jairaman und Prakriya, 2013). Eine bedeutende Rolle spielen CRAC-Kanäle auch bei der Aktivierung von T- und B-Zellen sowie Thrombozyten (Braun

et al., 2009; Hogan et al., 2010). Dies gilt hauptsächlich für CRAC-Kanäle, die von den Untereinheiten ORAI1 und STIM1 gebildet werden. Die Funktionen von ORAI2, ORAI3 und STIM2 sind noch wenig charakterisiert. Neben der beschriebenen Interaktion von ORAI- und STIM-Proteinen wird auch eine Interaktion zwischen STIM1 und TRPC-Kanälen in Verbindung mit SOCE diskutiert (Cahalan, 2009).

1.2.3 Kaliumkanäle

Bisher wurden mehr als 70 Gene im humanen Genom identifiziert, die für Untereinheiten funktioneller K^+ -Kanäle codieren. Keine andere Ionenkanalfamilie zeigt eine derartige Ubiquität der Expression und Vielfältigkeit der Funktion. K^+ -Kanäle lassen sich anhand der Struktur ihrer porenbildenden α -Untereinheiten in drei Hauptfamilien unterteilen (Abb. 1-3). Je nach Anzahl der Transmembransegmente (TM) unterscheidet man 2TM-, 4TM- und 6TM-Familien (Coetzee et al., 1999; Alexander et al., 2011). Die Transmembrandomänen sind α -Helices, welche vorwiegend aus hydrophoben Aminosäuren bestehen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Bezeichnung der K^+ -Kanalfamilien, ihrer Unterfamilien und deren Mitglieder entspricht der durch die *International Union of Pharmacology* (IUPHAR) empfohlenen Nomenklatur (Goldstein et al., 2005; Gutman et al., 2005; Kubo et al., 2005; Wei et al., 2005).

Kir-Kanäle (*inward rectifier*) gehören zur 2TM-Familie, deren α -Untereinheiten je zwei Transmembrandomänen und eine Porenregion umfassen. Die K^+ -Kanäle der 4TM-Familie (K2P) besitzen dagegen zwei Porendomänen je α -Untereinheit mit jeweils vier Transmembransegmenten. Aufgrund ihrer konstitutiven Öffnung zur Aufrechterhaltung eines negativen Membranpotentials wurden die Vertreter dieser Kanalfamilie auch als „Leck“-Kanäle bezeichnet (Goldstein et al., 1998). Zur 6TM-Familie gehören die spannungsabhängigen (Kv) und die Ca^{2+} -aktivierten (KCa) K^+ -Kanäle. Kv-Kanäle bilden die größte Gruppe der 6TM-Familie. Sie werden durch Änderungen des Membranpotentials aktiviert. KCa-Kanäle dagegen werden durch intrazelluläres Ca^{2+} aktiviert. Eine Zwischenstellung nehmen die BK-Kanäle (*big conductance*, KCa1.1, KNCMA1) ein, welche sowohl durch Ca^{2+} , als auch durch Depolarisation aktivierbar sind. Kv und KCa besitzen einen ähnlichen Domänenaufbau und ihre α -Untereinheiten bestehen aus je sechs Transmembrandomänen (TM) und einer porenbildenden Region. Nur BK-Kanäle verfügen zusätzlich über ein weiteres Transmembransegment im N-Terminus (Meera et al., 1997). Die Transmembransegmente TM1 bis TM4 der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle bilden die Spannungssensor-Domäne (*voltage sensor domain*, VSD) mit TM4 als eigentlichem

Spannungssensor. TM4-Segmente bilden amphipathische α -Helices mit mehreren positiv geladenen Aminosäureresten die zu einer Seite der Helix orientiert sind (Coetzee et al., 1999).

Je vier α -Untereinheiten bilden einen funktionellen K^+ -Kanal. K2P-Kanäle sind aus nur zwei α -Untereinheiten zusammengesetzt. Diese Tetramere beziehungsweise Dimere können homomer oder heteromer aus α -Untereinheiten der gleichen Unterfamilie zusammengesetzt sein und umgeben die für K^+ selektive Pore. MacKinnon und Kollegen konnten mittels Röntgenkristallstrukturanalyse des bakteriellen K^+ -Kanals KcsA die Struktur der Porenregion aufklären, welche in Prokaryoten wie Eukaryoten konserviert ist (Doyle et al., 1998; MacKinnon et al., 1998). Diese wird jeweils von zwei Transmembransegmenten und einer Porenschleife einer α -Untereinheit gebildet und beinhaltet zudem den Selektivitätsfilter mit der Aminosäure-Signatur TVGYG (Doyle et al., 1998).

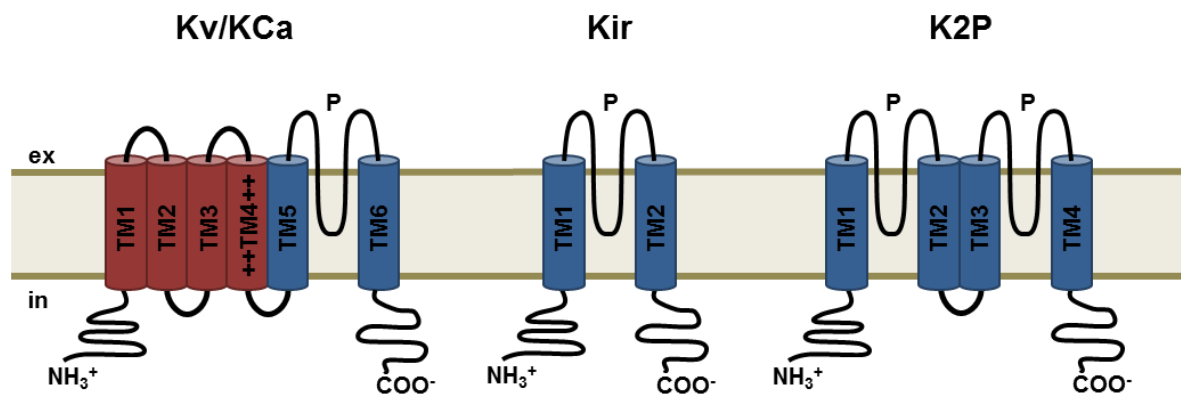


Abbildung 1-3: Topologie der α -Untereinheiten der drei K^+ -Kanalfamilien. Die jeweiligen α -Untereinheiten sind schematisch dargestellt. Die Membranorientierung ist angegeben als extrazellulär (ex) und intrazellulär (in). Die α -Untereinheiten der Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle (KCa) und der spannungsaktivierten K^+ -Kanäle (K_V) bestehen aus je sechs Transmembransegmenten (TM), wobei TM1-4 der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle die Spannungssensor-Domäne (in rot) bilden. Der eigentliche Spannungssensor, die TM4, verfügt über mehrere positiv geladene Aminosäuren, welche durch ein Pluszeichen (+) gekennzeichnet sind. Die porenbildende Region (P) umfasst TM5 und TM6 sowie die dazwischenliegende Porenschleife. Die α -Untereinheiten der Kir-Kanäle (*inward rectifier*) bestehen aus einer porenbildenden Region mit zwei Transmembransegmenten. Die α -Untereinheiten der K2P-Kanäle besitzen je zwei porenbildende Regionen (modifiziert nach Huang und Jan, 2014).

In nahezu allen Zellen des menschlichen Körpers führt das Öffnen von K^+ -Kanälen zum Ausstrom von Kaliumionen und damit zu einem negativeren Membranpotential. Die Richtung des Ionenflusses in Kanälen ist einzig durch den elektrochemischen Gradienten an der Membran bestimmt und kann von den Kanälen selbst nicht beeinflusst werden. Durch die permanente Aktivität der Na^+ - K^+ -ATPase, welche unter ATP-Verbrauch zwei K^+ in die Zelle und drei Na^+ aus der Zelle transportiert, ist die K^+ -Konzentration in Neuronen und den meisten anderen Zellen intrazellulär mehr als 30-fach höher als im extrazellulären Raum. In Ruhe wird das Membranpotential der meisten Zellen durch K^+ -Kanäle bestimmt, das heißt menschliche Zellen haben typischerweise ein negatives Ruhepotential, welches bis zu -85 mV betragen kann. Eine

weitere Absenkung des Potentials ist durch K^+ -Kanäle nicht möglich, da das normale K^+ -Gleichgewichtspotential bei etwa -90 mV liegt und weitere Hyperpolarisation die Flussrichtung der Kaliumionen umkehren würde. In Neuronen liegt das Ruhepotential an der Plasmamembran typischerweise im Bereich von -60 mV bis -80 mV, während es in nicht-erregbaren Zellen meist weniger negativ ist. Auch durch das Öffnen von Cl^- -Kanälen und Cl^- -Einstrom können Membranen hyperpolarisiert, also negativer werden, während die Aktivität von Na^+ -Kanälen zum Na^+ -Einstrom und damit zur Depolarisation einer Zelle führt.

1.2.4 Der KCa3.1-Kanal und die KCa-Familie

Der Kanal KCa3.1 gehört zur zweitgrößten Gruppe innerhalb der 6TM-Familie, den Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen. Synonyme für den gleichen Kanal sind KCNN4 (HGNC, *HUGO Gene Nomenclature Committee*) oder auch IK1, IKCa1, beziehungsweise SK4. Die Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle werden entsprechend ihrer Leitfähigkeit in BK- (*big conductance*), IK- (*intermediate conductance*) und SK-Kanäle (*small conductance*) unterteilt (Ishii et al., 1997; Gutman et al., 2005). KCa3.1 und die drei SK-Kanäle KCa2.1 (SK1), KCa2.2 (SK2) und KCa2.3 (SK3) weisen dabei eine Aminosäure-Sequenzidentität von 42-44% und eine Sequenzähnlichkeit von 50-55% auf, weshalb KCa3.1 häufig auch als SK4 bezeichnet wird (Köhler et al., 1996; Ishii et al., 1997). KCa-Kanäle bilden tetramere Kanalkomplexe mit α -Untereinheiten bestehend aus sechs Transmembransegmenten sowie cytoplasmatisch gelegenen C- und N-Termini. KCa3.1 und die verschiedenen KCa2.x-Kanäle werden durch submikromolare Konzentrationen an intrazellulären Ca^{2+} aktiviert (EC_{50} -Werte für KCa3.1 von 95-350 nM) und sie sind im Gegensatz zu KCa1.1 spannungsunabhängig (Grissmer et al., 1993; Ishii et al., 1997; Joiner et al., 1997; Logsdon et al., 1997; Xia et al., 1998). Die Ca^{2+} -Aktivierung von KCa3.1 und KCa2.x-Kanälen wird durch Calmodulin vermittelt, das am C-Terminus jeder α -Untereinheit konstitutiv gebunden ist (Xia et al., 1998; Fanger et al., 1999), während KCa1.1 eigene Ca^{2+} -Bindestellen im C-Terminus besitzt. KCa4.1, KCa4.2 und KCa5.1 werden aufgrund struktureller Ähnlichkeit ebenfalls zur KCa-Gruppe gerechnet, sie weisen aber andere Aktivierungsmechanismen auf (Gutman et al., 2005).

In der experimentellen Praxis sind pharmakologische Wirkstoffe sehr hilfreich zur Differenzierung der KCa-Kanäle. Die KCa2.x-Kanäle lassen sich pharmakologisch durch ihre Sensitivität gegenüber Apamin und Unempfindlichkeit gegenüber Charybdotoxin (ChTx) und Clotrimazol von den anderen KCa-Kanälen unterscheiden. Dagegen blockt ChTx KCa3.1 (IC_{50} : 5 nM) und KCa1.1, aber auch den spannungsaktivierten Kanal Kv1.3 (Gutman et al., 2005; Wulff und Castle, 2010). Clotrimazol wurde als spezifischer KCa3.1-Blocker eingeführt, jedoch zeigten sich in Tierversuchen Nebenwirkungen durch akute Inhibition und chronische Induktion der humanen Cytochrom P450-abhängigen Enzyme (Suzuki et al., 2000; Luo et al., 2002). Ausgehend von

Clotrimazol entwickelten Wulff und Kollegen die Substanz TRAM-34 (IC_{50} : 20 nM), die sich durch höhere Spezifität auszeichnet (Wulff et al., 2000). TRAM-34 bindet wie Clotrimazol an Aminosäuren in der Porenöffnung (Thr250, Val275) des KCa3.1-Kanals und verhindert so den K^+ -Strom (Wulff et al., 2001).

Eine Expression des Kanals KCa3.1 konnte beim Menschen außer im Zentralnervensystem in fast allen Geweben nachgewiesen werden. KCa3.1-Transkripte sind besonders stark exprimiert in Zellen, die aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen, wie Erythrozyten, Lymphozyten, Thrombozyten, Monozyten und Mastzellen sowie in epithelialen und endothelialen Geweben der Lunge, Niere, Darm, Prostata, Plazenta und Speicheldrüsen (Ishii et al., 1997; Joiner et al., 1997; Logsdon et al., 1997). Im Einklang mit diesen breiten Expressionsmuster erfüllen KCa3.1-Kanäle sehr viele verschiedene physiologische Aufgaben.

Die Regulation des Zellvolumens war eine der ersten physiologischen Funktionen, mit der KCa3.1, damals noch als „Gardos-Kanal“ bezeichnet (Gardos, 1958), in Verbindung gebracht wurde. Die von Gardos bereits Ende der fünfziger Jahre durchgeführten Studien zeigten, dass durch Ca^{2+} -Einstrom aktivierter K^+ -Ausstrom mit einem Verlust von Cl^- und damit verbundenem Wasserverlust einhergeht und schließlich zum Schrumpfen der roten Blutkörperchen führt. Eine Bedeutung von KCa3.1 für die Regulation des Elektrolyt- und Wassertransports konnte auch in verschiedenen Epithelien festgestellt werden (Wulff und Castle, 2010).

Eine besonders gut untersuchte Funktion von KCa3.1 ist die Kontrolle des Ca^{2+} -Einstroms in Zellen durch Regulation des Membranpotentials (Chandy et al., 2004; Lallet-Daher et al., 2009). Wie bereits dargelegt, ist für Ca^{2+} -abhängige Prozesse wie beispielweise für die Zellproliferation oder die Sekretion das anhaltende Aufrechterhalten eines Ca^{2+} -Einstroms über die Zellmembran von besonderer Bedeutung. Der Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanal KCa3.1 kann dies durch Absenken des Membranpotentials begünstigen. Durch jeden Ca^{2+} -Einstrom kommt es lokal zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und damit zur Depolarisation der Membran, was einen weiteren Einstrom von Ca^{2+} limitiert. Durch den Ca^{2+} -Anstieg werden aber gleichzeitig auch KCa3.1-Kanäle geöffnet und es kommt zur Hyperpolarisation der Membran, welche den Ca^{2+} -Einstrom und die darauffolgenden Signale begünstigt. Der Ca^{2+} -Einstrom, der zur Aktivierung der KCa3.1-Kanäle führt, kann zum Beispiel über spannungsunabhängige CRAC (*Ca²⁺ release-activated Ca²⁺*)- oder TRP (*transient receptor potential*)-Kanäle erfolgen (Abb. 1-4). Ein Zusammenspiel dieser Kanäle ist beispielsweise erforderlich für die Proliferation von T- und B-Zellen oder auch für die Sekretion von Chemokinen und Cytokinen durch Immunzellen (Chandy et al., 2004; Wulff und Castle, 2010). Weiterhin zeigten mehrere Studien, dass KCa3.1 auch für die Migration verschiedener Zelltypen wie Makrophagen und Mikrogliazellen benötigt wird und bei letzteren auch in die

Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und in die NO-Produktion involviert ist (Wulff und Castle, 2010).

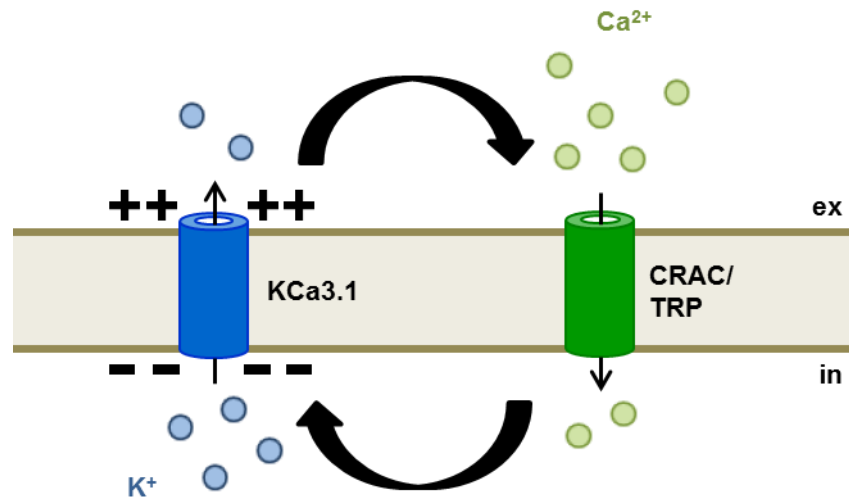


Abbildung 1-4: KCa3.1-Aktivierung führt zur Hyperpolarisation der Membran und ermöglicht einen verstärkten Ca²⁺-Einstrom über spannungsunabhängige Ca²⁺-Kanäle. Der Ca²⁺-Einstrom in die Zelle ist meist durch die damit verbundene Depolarisation der Membran limitiert. Jedoch können durch die lokale Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration Ca²⁺-aktivierte Kaliumkanäle wie KCa3.1 aktiviert werden und zu einer Hyperpolarisation der Membran führen. Dadurch kann der Ca²⁺-Einstrom über spannungsunabhängige CRAC (Ca²⁺ release-activated Ca²⁺)- oder TRP (transient receptor potential)-Kanäle aufrechterhalten werden und Ca²⁺-abhängige Prozesse wie Proliferation und Migration werden begünstigt. Die Membranorientierung ist angegeben als extrazellulär (ex) und intrazellulär (in).

1.3 Ca²⁺-Homöostase und Krebs

Krebs entsteht durch Mutationen im Genom, welche es den Zellen erlauben, unabhängig zu proliferieren und Apoptosesignalen zu entkommen. Weitere Eigenschaften, die Krebszellen besitzen, sind eine unbegrenzte Replikation durch Hochregulation der Telomeraseaktivität, die Aufrechterhaltung der Angiogenese zur Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie Gewebeinvasion und Metastasierung. Für viele dieser Prozesse wurde eine Abhängigkeit von der intrazellulären Ca²⁺-Homöostase beschrieben (Roderick und Cook, 2008; Hanahan und Weinberg, 2011).

Freies Ca²⁺ wird während des Zellzyklus vor allem in der frühen G1-Phase sowie während des G1/S- und G2/M-Übergangs benötigt. Ca²⁺ reguliert die Expression und Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren in der G1-Phase wie CREB (*cAMP response element-binding protein*), NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) und AP-1 (*activator protein 1*). Für einen reibungslosen Ablauf der G1-Phase und Mitose wird auch Ca²⁺-gebundenes Calmodulin (CaM) benötigt (Rasmussen und Means, 1989; Kahl und Means, 2003). Ca²⁺ ist zudem in die Aktivierung von Cyclinen und CDKs (*cyclin-dependent kinases*) involviert. Darüber hinaus kontrolliert Ca²⁺ die Duplikation und Trennung der Zentrosome (Roderick und Cook, 2008). Diese vielfältigen

Verbindungen zwischen der Kontrolle des Zellzyklus und der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol legen nahe, dass sich jede Änderung in der Expression oder Aktivität von Proteinen, die an der Ca^{2+} -Homöostase beteiligt sind, auch auf die Kontrolle des Zellzyklus auswirken kann. Möglicherweise sind also solche Veränderungen mit daran beteiligt, dass sich Krebszellen der strengen Zellzykluskontrolle entziehen und sich ungehindert teilen können.

Eine Änderung der Expression einzelner Ca^{2+} -Transportproteine wurde in verschiedenen Arten von Krebszellen gefunden (Monteith et al., 2012). Sowohl Ca^{2+} -Pumpen als auch Ionenkanäle wie CaV- oder TRP-Kanäle können eine abnorme Expression in Krebszellen aufweisen. Erhöhte Expression von Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran kann den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle steigern und so Ca^{2+} -abhängige Signalwege der Proliferation fördern. Immer mehr Studien zeigen, dass Ca^{2+} -Einstrom für die Proliferation von Krebszellen von Bedeutung ist. So wurde beschrieben, dass T-Typ Ca^{2+} -Kanäle bei der Proliferation von Brustkrebs, kolorektalem Karzinom, Magenkarzinom sowie Prostatakrebs beteiligt sind (Panner und Wurster, 2006). Kürzlich wurde in Prostatakrebs-Zelllinien gezeigt, dass Ca^{2+} -Einstrom über TRPV6 zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT und schließlich zur Zellproliferation führt (Lehen'kyi et al., 2007). Auch andere Ionenkanäle, die indirekten Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase nehmen, können eine veränderte Expression zeigen. So zum Beispiel Mitglieder der P2X-Rezeptorfamilie, welche zur Gruppe der ligandengesteuerten Ionenkanäle gehören (Li et al., 2006), oder auch Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle (Lallet-Daher et al., 2009), worauf im nächsten Abschnitt noch genauer eingegangen wird. Während eine erhöhte Expression von Ca^{2+} -Kanälen zu vermehrtem Ca^{2+} -Einstrom führt und die Proliferation von Krebszellen fördert, führt Überexpression der membranständigen Ca^{2+} -Pumpe PMCA zu einer Verringerung des Ca^{2+} -Gehalts im ER und dies reduziert die Sensitivität gegenüber Signalen, die Apoptose auslösen (Brini et al., 2000; Pinton und Rizzuto, 2006). Neben einer erhöhten Expression kann auch eine Änderung der Lokalisation von Ca^{2+} -Kanälen zur Krebsentwicklung beitragen (Zhang und Barritt, 2004; Thebault et al., 2005).

Änderungen im Ca^{2+} -Haushalt durch veränderte Expression oder Aktivität von Ca^{2+} -Pumpen oder Ionenkanälen kann zudem Einfluss auf die Migrationseigenschaften und damit auf die Tumormetastasierung und -vaskularisation von Krebszellen haben. Hier wurde in verschiedenen Studien vor allem den TRP-Kanälen eine bedeutende Rolle zugewiesen (Prevarskaya et al., 2011; Fiorio Pla und Gkika, 2013), aber auch ORAI1 und STIM1 zeigten migrationsfördernde Funktionen (Yang et al., 2009).

Ca^{2+} -Pumpen, Ca^{2+} -Kanäle und weitere Ionenkanäle, die die Ca^{2+} -Homöostase beeinflussen, stellen potentielle therapeutische Targets dar, vor allem da für diese Proteine oft schon spezifische pharmakologische Aktivatoren und Inhibitoren existieren. Ca^{2+} kann je nach Ort, Amplitude und

Dauer des Ca^{2+} -Anstiegs zu unterschiedlichen Wirkungen führen. So kann ein Ca^{2+} -Anstieg proliferationsfördernd sein, aber auch zum Tod der Zelle führen (Berridge et al., 2003; Rizzuto und Pozzan, 2006). Im Hinblick auf eine Krebsbehandlung kann man also verschiedene Therapieansätze verfolgen. Zum einen kann versucht werden, durch Beeinflussung der Ca^{2+} -Homöostase die Proliferation der Krebszellen zu verringern. Zum anderen könnte man versuchen, die Ca^{2+} -Konzentration in Tumorzellen so zu verändern, dass Apoptose leichter ausgelöst werden kann. Aktivatoren von Ca^{2+} -Kanälen und Inhibitoren von Ca^{2+} -Pumpen führen zu stark erhöhten und anhaltenden cytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen und lösen Apoptose aus (Zhang und Barritt, 2004; Denmeade und Isaacs, 2005). Inhibitoren von Ca^{2+} -Kanälen hingegen können potentiell die Proliferation oder auch Invasion von Krebszellen mindern. Daher rücken Inhibitoren von Ca^{2+} -Kanälen der Plasmamembran als potentielle Therapietargets immer stärker in den Fokus (Ishiuchi et al., 2002; Enfissi et al., 2004; Gray und Macdonald, 2006; Monteith et al., 2007).

1.4 K^+ -Kanäle und Krebs

Einige Erkrankungen wie Epilepsie, Herzrhythmusstörungen, Bluthochdruck, Diabetes oder neuromuskuläre Störungen können durch abnormale Expression von K^+ -Kanälen oder Mutationen in deren Genen ausgelöst werden. Krankheiten, die in Verbindung mit Ionenkanälen stehen, werden als *channelopathies* bezeichnet. Zunehmend wird auch über eine Beteiligung von K^+ -Kanälen bei Krebsentstehung und -entwicklung berichtet (Schönherr, 2005; Roger et al., 2006; Cuddapah und Sontheimer, 2011; Prevarskaya et al., 2011; Santoni und Farfariello, 2011; Monteith et al., 2012; Pardo und Stühmer, 2014). Offenbar können also auch solche Ionenkanäle Einfluss auf onkogene Prozesse nehmen, die nicht direkt an der Ca^{2+} -Homöostase beteiligt sind. Ähnliches gilt auch für Na^+ - und Cl^- -Kanäle.

Nach Huang et al. gibt es vier mögliche Mechanismen, wie K^+ -Kanäle den Zellzyklus regulieren: Erzeugung von Oszillationen des Membranpotentials, Kontrolle des Zellvolumens, Regulierung verschiedener Ca^{2+} -Signalwege sowie nichtkanonische Funktionen, das heißt unabhängig von der Ionenleitfähigkeit des Kanals (Huang und Jan, 2014). Überexpression, veränderte Aktivität oder veränderte Lokalisation von K^+ -Kanälen kann in diese Prozesse eingreifen und Tumorwachstum begünstigen. Dies wurde für einige Krebsarten berichtet (Bielanska et al., 2009; Williams et al., 2013; Pardo und Stühmer, 2014). Zudem konnte bei vielen Krebsarten durch pharmakologische Inhibition oder genetische Suppression von K^+ -Kanälen das Tumorwachstum reduziert werden (Pardo und Stühmer, 2014; Urrego et al., 2014).

Vorübergehende Änderungen des Membranpotentials während des Zellzyklus spielen eine wichtige Rolle bei Tumorentstehung und -progression. Für schnell proliferierende Zellen wie Krebszellen konnte gezeigt werden, dass diese mehr depolarisiert sind als ausdifferenzierte, gesunde Zellen. Depolarisation wurde als ein Initiator der Zellteilung beschrieben (Yang und Brackenbury, 2013). Demgegenüber erfordert der G1/S-Übergang eine transiente Hyperpolarisation, welche meist auf eine gesteigerte Membranpermeabilität für Kaliumionen zurückzuführen ist (Wonderlin et al., 1995). Es wird angenommen, dass durch Hyperpolarisation der passive Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen verstärkt wird und so Ca^{2+} -abhängige Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die wiederum die Expression von Cyclinen und CDKs erhöhen beziehungsweise *CDK inhibitor*-Proteine (CDKi) inhibieren (Roderick und Cook, 2008). Dass KCa3.1 den Ca^{2+} -Einstrom und somit die Proliferation fördern kann, konnte bereits in LNCaP-Zellen (Prostatakrebs-Zelllinie) gezeigt werden. Der Ca^{2+} -Einstrom erfolgte hier über den konstitutiv aktiven TRPV6-Kanal (Lallet-Daher et al., 2009). Weiterhin konnte eine Bedeutung von KCa3.1 für die G1-Phase, den G1/S-Übergang und die G2/M-Phase nachgewiesen werden. KCa3.1 spielt nicht nur eine Rolle bei der Proliferation, sondern auch bei der Migration von Krebszellen (Ouadid-Ahidouch et al., 2004; Tao et al., 2008; Faouzi et al., 2010; Catacuzzeno et al., 2012).

1.5 Melanom und Therapiemöglichkeiten

Das maligne Melanom, auch allgemein bekannt als schwarzer Hautkrebs, ist eine der aggressivsten und therapieresistentesten Krebsformen. Die Anzahl der weltweiten Neuerkrankungen stieg in den letzten Jahrzehnten erheblich an (Berwick et al., 2009; Garbe und Leiter, 2009). Die Inzidenz ist in Nordamerika und Nordeuropa besonders hoch, am höchsten ist sie aber in Australien und Neuseeland (GLOBOCAN 2012; globocan.iarc.fr/), wo viele hellhäutige Menschen starker Sonnenstrahlung ausgesetzt sind. Allein in Deutschland gab es in den Jahren 2009 und 2010 pro Jahr etwa 19 200 Neuerkrankungen. Dabei waren Männer und Frauen etwa gleich stark betroffen. Die Erkrankungsrate ist hierzulande seit 1999, bei gleichbleibender Sterberate, um etwa 30% angestiegen (Abb. 1-5). Die Einführung der Früherkennungsuntersuchung zum Hautkrebs 2008 führte zu einem Sprung in der Rate der erkannten Krankheiten um 20% zum Vorniveau („Krebs in Deutschland 2009/2010“, Robert Koch-Institut, 2013). Früherkennung und eine vermehrte Aufklärung der Bevölkerung sind also sicher ein Grund für die Inzidenzzunahme. Ein weiterer Grund ist das veränderte Sonnen-Expositionsverhalten, da immer mehr Menschen, insbesondere im Alter unter 30 Jahren, natürlicher oder künstlicher UV-Strahlung ausgesetzt sind (Gandini et al., 2011).

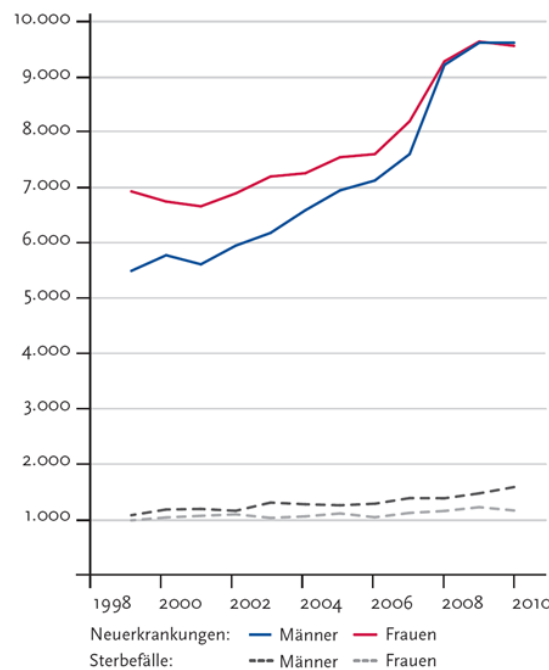


Abbildung 1-5: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle beim malignen Melanom in Deutschland von 1999-2010. Dargestellt ist die Zunahme der Inzidenz des malignen Melanoms bei Männern und Frauen (durchgezogene Linien) in Deutschland von 1999 bis 2010 um etwa 30% bei gleichbleibender Sterberate (gestrichelte Linien). Abbildung entnommen aus „Krebs in Deutschland 2009/2010“ (Robert Koch-Institut, 2013).

Nach wie vor bestehen mit der Früherkennung eines malignen Melanoms die größten Chancen auf Heilung. In einem frühen Stadium der Erkrankung, das heißt wenn der Tumor klein und dünn ist (≤ 2 mm nach der Breslow-Methode) und noch nicht in Lymphknoten oder andere Organe gestreut hat, wird dieser meist operativ entfernt und die Prognosen für die Patienten sind gut. Aufgrund der Diagnose vieler maligner Melanome in einem frühen Stadium liegen die 5-Jahres-Überlebensraten in Deutschland bei 94% für Frauen und bei 89% für Männer („Krebs in Deutschland 2009/2010“, Robert Koch-Institut, 2013). Sobald es zur Metastasierung kommt, sind die Prognosen jedoch sehr schlecht. Die Sterblichkeit für Patienten mit fortgeschrittenem Krankheitsbild (tiefgehende Primärtumoren oder Tumoren mit Lymphknoten- und Fernmetastasen, Stadium 4-Melanom) ist sehr hoch und das mediane Gesamtüberleben liegt bei nur 6 bis 9 Monaten, die 3-Jahres-Überlebensrate bei etwa 10-15% (Balch et al., 2009). Dies liegt vor allem an einem Mangel an wirksamen Behandlungsmöglichkeiten. Diese Krebsform ist sehr resistent gegenüber Radiotherapie und chemotherapeutischen Mitteln. Zudem gab es seit der Zulassung des Chemotherapeutikums Dacarbazine im Jahr 1975 (Deutschland), welches eine Ansprechrate bei Patienten mit metastasiertem malignen Melanom von weniger als 10% aufweist (Ji et al., 2010), bis vor kurzem keine neuen Therapieansätze, die zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens geführt haben.

Mediziner sprechen aktuell über eine neue Ära im Melanom-Management und bei der Behandlung des Melanoms. Vor allem die Aufklärung zellulärer Signalwege und die Identifikation wichtiger

Onkogene in den letzten 10 Jahren ermöglichen gegenwärtig die Entwicklung zielgerichteter Therapieformen. Auch neue Immuntherapien werden getestet, so zum Beispiel der humane monoklonale Antikörper Ipilimumab (Yervoy®), welcher den T-Zellrezeptor CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4) blockiert und damit die T-Zellaktivierung und Proliferation anregt (Peggs et al., 2006). Eine Testreihe für *First-Line*-Behandlung in 2011 zeigte nur eine kleine, aber signifikante Verbesserung der medianen Überlebensrate von Patienten, welche eine Kombinationsbehandlung mit Dacarbazine und Ipilimumab erhielten, verglichen mit Patienten, die nur mit Dacarbazine allein behandelt wurden. Die Steigerung der Überlebensrate betrug jedoch nur 2,1 Monate. Seit etwa 30 Jahren war dies aber die erste Phase III-Studie mit signifikanter Steigerung des medianen Überlebens sowie des Langzeitüberlebens von Patienten eines metastasierenden Melanoms (Robert et al., 2011). Weitere Therapieansätze zielen auf die im Melanom aktivierten Signalwege wie MAPK- und PI3-Kinase-Signalweg ab (Vultur et al., 2011; Ji et al., 2012; Sullivan und Flaherty, 2013). Da 50-60% der Melanompatienten eine Mutation in *BRAF* und etwa 20% der Patienten eine *NRAS*-Mutation tragen (Davies et al., 2002; Omholt et al., 2003), erscheinen diese Signalwege als sehr vielversprechend (Abb. 1-6). Jedoch werden bei Monotherapien häufig Ausweichmechanismen aktiviert, die letztlich zu Resistenzen führen.

Man kann sagen, dass die Medizin derzeit „einen Fuß in der Tür“ zur zielgerichteten Melanomtherapie hat. Dabei handelt es sich immer noch um recht kleine Effekte und Monotherapien sind bisher nicht ausreichend, um eine langfristige Heilung zu erzielen. In Zukunft werden neue Wirkstoffe und vor allem Kombinationen verschiedener Wirkstoffe, die auf mehrere Signalwege abzielen, im Mittelpunkt der Forschung stehen.

Aus biologischer Sicht ist das maligne Melanom ein bösartiger Tumor der Pigmentzellen (Melanozyten), welcher sich in der Haut manifestiert, selten aber auch in Schleimhäuten, Hirnhäuten oder im Auge. Melanozyten synthetisieren Melanin, welches in Form von Melanosomen an umliegende Keratinozyten weitergegeben wird. Melanin bestimmt die Intensität der Hauttönung und stellt einen wichtigen Schutz vor DNA-Schäden durch UV-Strahlung dar. Die Transformation von gesunden Melanozyten zur malignen Form setzt eine Akkumulation mehrerer Mutationen in wichtigen Genen voraus, die für die Regulation von Proliferation, Migration und Apoptose der Melanozyten von Bedeutung sind. Die Entwicklung maligner Veränderungen geht dabei nicht zwingend linear vom Nävus zum metastatischen Melanom. Melanozyten können auch direkt zu aggressiven Zellen werden und zum Beispiel in eine radiale Wachstumsphase übergehen.

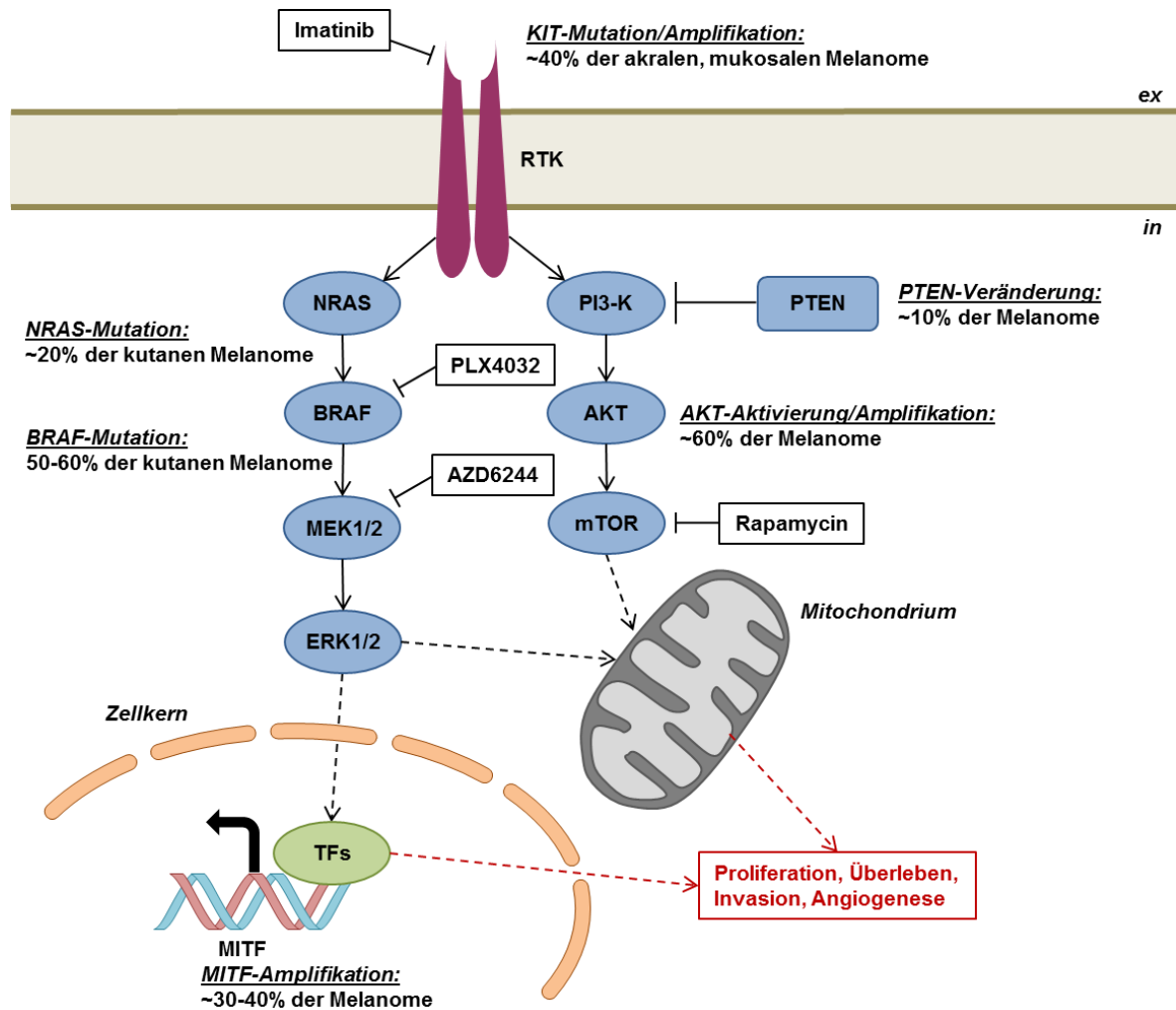


Abbildung 1-6: Vereinfachtes Schema zweier bedeutender Signalwege im malignen Melanom: MAPK- und PI3-Kinase-Signalweg – Mutationen sowie Angriffspunkte für Wirkstoffe in der Melanomtherapie. In fast allen malignen Melanomen ist der MAPK-Signalweg aktiviert. Zentraler Bestandteil des Signalweges ist die NRAS-BRAF-MEK1/2-ERK1/2-Kaskade. Am häufigsten sind Mutationen des G-Proteins NRAS oder der Serin/Threonin-Kinase BRAF im Melanom zu finden. Aber auch eine Aktivierung oder Amplifikation von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) wie zum Beispiel KIT führt zur Aktivierung des MAPK-Signalweges. Dies führt schließlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (TF) im Zellkern und Induktion verschiedener Gene wie MTF (*microphthalmia transcription factor*), welche Zellwachstum, Differenzierung und Proliferation vermitteln. Im malignen Melanom ist auch häufig der PI3-Kinase (Phosphatidylinositol 3-Kinase)-Signalweg aktiviert, meist durch Verlust der Phosphatase PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) oder Aktivierung der Proteinkinase AKT, und anti-apoptotisch wirkt. In den Boxen sind ausgewählte Wirkstoffe aufgeführt, welche onkogen veränderte Proteine dieser Signalwege blockieren und in der Melanomtherapie verwendet werden. Die Membranorientierung ist angegeben als extrazellulär (ex) und intrazellulär (in) (modifiziert nach Ji et al., 2012).

1.6 Relevante Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

In Zusammenarbeit mit K. Hoek und R. Dummer von der Universität Zürich wurden mithilfe eines Affymetrix-Expressionsassays Melanozyten und primäre Kulturen humaner Melanommetastasen untersucht. In diesem Zusammenhang wurden vier (KCa3.1, Kv6.1, Kir6.1, K2P2.1) von acht Kaliumkanälen mit erhöhtem mRNA-Level in Melanomzellen gefunden, wobei das mRNA-Signal für den KCa3.1-Kanal in allen Melanomproben erhöht war. Weiterhin wurde in den

Melanomzelllinien IGR1 und IGR39 unter hypoxischen Bedingungen (3% Sauerstoff) eine zwei- bis dreifach erhöhte KCa3.1-Expression gefunden. Eine KCa3.1-spezifische Inhibition des K^+ -Stroms mit Charybdotoxin führte zu einer Reduktion der Proliferation in diesen Zelllinien (Tajima et al., 2006). In weiteren Experimenten konnte durch Verwendung des KCa3.1-spezifischen Blockers TRAM-34 auch eine verringerte Proliferation von A375- und Mel Im-Zellen beobachtet werden. Diese beiden Melanomlinien wurden vor allem im Forscherverbund „*Melanoma Research Network*“ (Deutsche Krebshilfe) untersucht. In Abbildung 1-7 sind als Beispiel die Ergebnisse von Proliferationsstudien an A375-Zellen gezeigt. Sowohl in MTT-Assays, wo die metabolische Aktivität der Zellen als Maß für die Proliferation dient, als auch bei einfacher Zellzahlbestimmung konnte mit TRAM-34 dosisabhängig eine Reduktion der Proliferation beobachtet werden (Daten zur Verfügung gestellt von N. Buttstädt). Auch Experimente zum Migrationsverhalten zeigten, dass die Migration von Mel Im-Zellen durch Zugabe von TRAM-34 herabgesetzt wird (Daten unveröffentlicht).

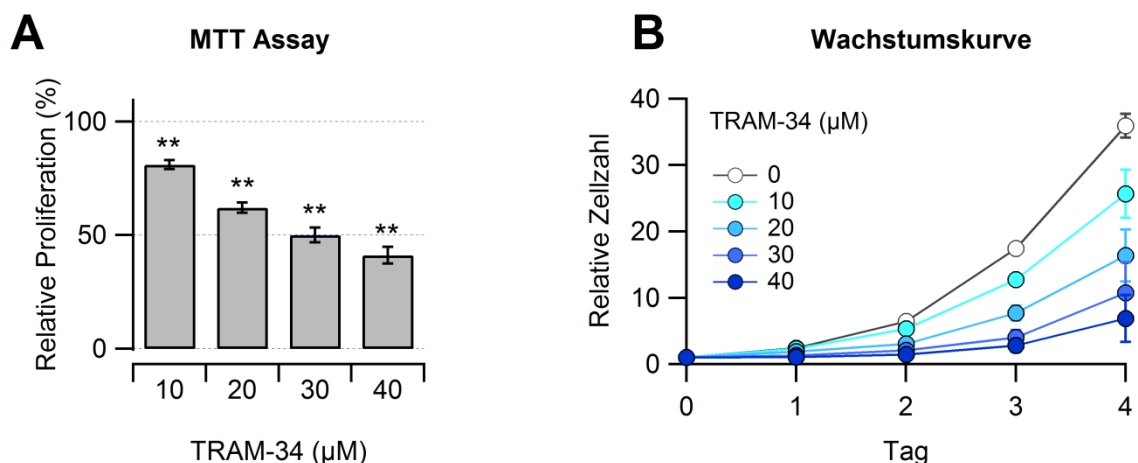


Abbildung 1-7: KCa3.1-Blocker TRAM-34 reduziert die Proliferation von A375-Zellen. Untersuchung der Zellproliferation von A375-Zellen in Abhängigkeit des KCa3.1-Inhibitors TRAM-34. **(A)** Bestimmung der relativen Proliferation (%) mittels MTT-Assay in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen an TRAM-34. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM, normiert auf DMSO-behandelte Zellen, ermittelt aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Unabhängiger Zweistichproben-t-Test, ** $P < 0,01$. **(B)** Bestimmung der relativen Zellzahl in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen an TRAM-34. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM, normiert auf die Ausgangszellzahl, ermittelt aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

1.7 Zielstellung der Arbeit

Ionenkanäle sind grundsätzlich interessante Kandidaten für die Entwicklung neuer Therapieansätze zur Tumorbehandlung, da sie als membranständige Proteine für ihre spezifischen Inhibitoren gut zugänglich sind. Aus Vorarbeiten war bereits bekannt, dass der Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanal KCa3.1 in mehreren Melanomzelllinien exprimiert wird und dass der spezifische KCa3.1-Blocker TRAM-34 die Proliferation und Migration dieser Zellen reduziert. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen waren dagegen weitgehend unbekannt. Da KCa3.1-Kanäle selbst Ca^{2+} -abhängig sind und sowohl Proliferation als auch Migration durch die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst werden, war eine naheliegende Hypothese, dass KCa3.1-Kanäle die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase beeinflussen können und so in zelluläre Funktionen eingreifen. K^+ -Kanäle können ein negativeres Membranpotential in einer Zelle bewirken (Hyperpolarisation) und so den Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle begünstigen. Diese Hypothese setzt voraus, dass neben dem K^+ -Kanal auch ein oder mehrere verschiedene Ca^{2+} -Kanäle in der Zelle vorkommen.

Um diesen Sachverhalt zu klären, sollten zunächst weitere Melanomlinien mit besonderer Bedeutung für den Forscherverbund „*Melanoma Research Network*“ auf eine funktionelle Expression von KCa3.1 hin untersucht werden. Anschließend sollte überprüft werden, ob der KCa3.1-Kanal einen Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in Melanomzellen hat. Komplementär zu den Arbeiten an K^+ -Kanälen sollte systematisch nach Ca^{2+} -Kanälen in Melanomzellen gesucht werden. Hierzu sollte vorrangig das Vorkommen von TRP- und CRAC-Kanälen überprüft werden, da diese als spannungsunabhängige Ca^{2+} -Kanäle prinzipiell in der Lage wären, einen verstärkenden Regelkreis mit dem Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanal zu bilden (Abb. 1-8). Im Gegensatz dazu würden spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle durch die hyperpolarisierende Wirkung eines K^+ -Ausstroms eher negativ beeinflusst. Für eventuell nachgewiesene Ca^{2+} -Kanäle sollte anschließend geprüft werden, welche Relevanz ihre Aktivität hinsichtlich der Proliferation und Migration von Melanomzellen hat. Die in dieser Arbeit zu behandelnden Fragen sind in Abbildung 1-8 schematisch zusammengefasst.

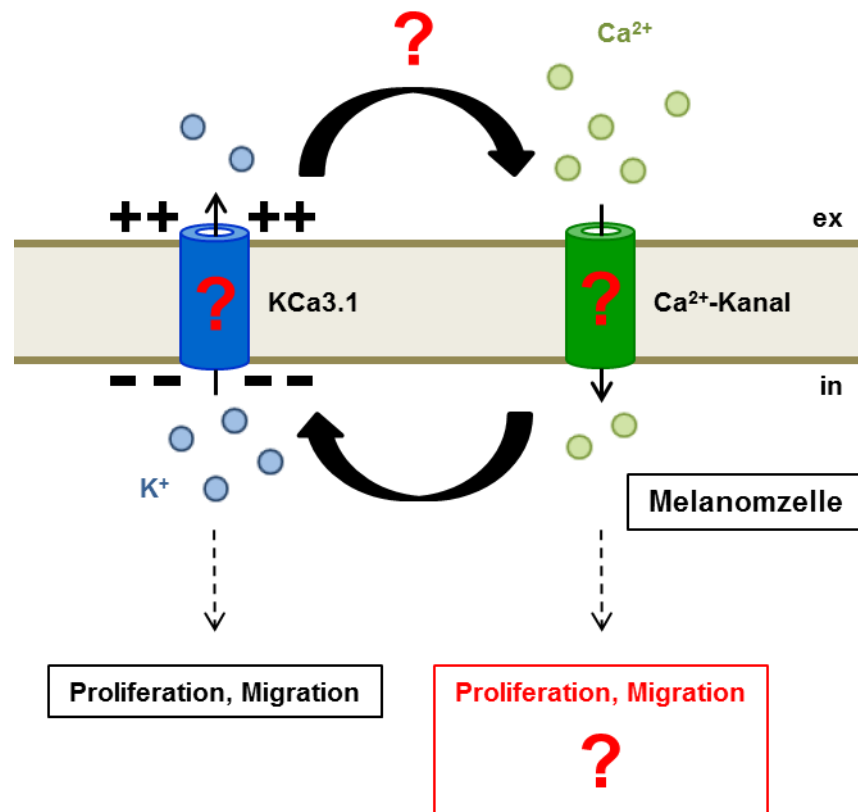


Abbildung 1-8: Zielstellung der Arbeit. Dargestellt sind die vier Untersuchungsschwerpunkte (markiert mit „?“) dieser Arbeit: Analyse der funktionellen Expression von KCa3.1 in ausgewählten Melanomlinien des Forscherverbundes „Melanoma Research Network“, Einfluss des KCa3.1-Kanals auf die Ca²⁺-Homöostase, und Untersuchung der Expression spannungsunabhängiger Ca²⁺-Kanäle sowie deren Einfluss auf die Migration und Proliferation der Melanomlinien. Die Membranorientierung ist angegeben als extrazellulär (ex) und intrazellulär (in).

2 Methoden

2.1 Lösungen und Chemikalien

Alle Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser aus einem Wasseraufbereitungssystem angesetzt (*Synergy Ultrapure Water System*, Millipore, Billerica, MA, USA).

- PBS-Puffer:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10 mM
KH_2PO_4	1,76 mM
NaCl	137 mM
KCl	2,67 mM
pH 7,4 (HCl)	
- TRAM-34 (freundlich zur Verfügung gestellt von H. Wulff, University of California, Davis, CA, USA)
- Thapsigargin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- 2-APB (2-Aminoethoxydiphenylboran, Tocris Biosciences, Bristol, UK)
- Capsaicin (Sigma-Aldrich)
- Probenecid (Sigma-Aldrich)
- 4α -PDD (*4 α -Phorbol-12,13-didecanoate*, Sigma-Aldrich)
- GSK1016790A (Sigma-Aldrich)
- HC-067047 (Tocris Biosciences)
- DMSO (Sigma-Aldrich)

2.2 Zellkultur

Alle zellbiologischen Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank (Thermo Electron Corporation, Beverly, MA, USA). Verwendete Kulturmedien, Lösungen und Puffer sowie Verbrauchsmaterialien wurden entweder steril erworben oder durch Autoklavieren sowie Behandlung mit 70%igem Ethanol sterilisiert. Medien, Puffer und Trypsin wurden vor Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

2.2.1 Kulturmedien, Puffer und Chemikalien für Zellkulturarbeiten

- Trypsin/EDTA (0,05% / 0,02% in PBS; PAA, Pasching, Österreich)
- Ham's F12 (Gibco, Darmstadt)
- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, 4,5 g/l Glukose, mit L-Glutamin, Gibco)
- RPMI 1640/Glutamin (Gibco)
- FKS (fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert und steril filtriert; Biochrom, Berlin)

2.2.2 Zelllinien

HEK 293

Bei den verwendeten HEK 293-Zellen handelt es sich um eine adhärente Zelllinie, die ursprünglich durch Transformation mit Adenovirus Typ 5 aus humanen embryonalen Nierenzellen (*human embryonic kidney*) generiert wurden (Graham et al., 1977). Erworben vom Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig).

A375

Adhärente humane Melanomzelllinie, ursprünglich aus der Haut eines weiblichen Melanompatienten isoliert. Erworben von ATCC® (Manassas, USA).

Mel Im

Adhärente humane Melanomzelllinie, ursprünglich aus einer Biopsieprobe einer Melanommetastase generiert. Freundlich zur Verfügung gestellt von Dr. Jennifer Schmidt, Universität Regensburg.

IGR1

Adhärente humane Melanomzelllinie, isoliert aus einer Lymphknotenmetastase der Leistenbeuge. Erworben vom Leibniz-Institut DSMZ.

SK-Mel 28

Adhärente humane Melanomzelllinie, ursprünglich aus der Haut eines männlichen Melanompatienten isoliert. Erworben von ATCC®.

Ma-Mel-86

Adhärente humane Melanomzelllinie, isoliert aus einer Lymphknotenmetastase. Freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Dirk Schadendorf, Universitätsklinikum Mannheim.

2.2.3 Kultivierung der Zelllinien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 25 cm² sowie 75 cm² Kulturflaschen in einem Brutschrank (Heraeus Instruments GmbH, Hanau) bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ für HEK 293-Zellen beziehungsweise 10% CO₂ für die Melanomzelllinien. Die Zelllinien wurden in den entsprechenden Kulturmedien (s. Tab. 2.1) mit je 10% fötalem Kälberserum (FKS) kultiviert und bei einer Konfluenz von 90-100% passagiert. Zum Ablösen der adhärenen Zellen wurde

zunächst das alte Medium entfernt, dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml (25 cm²) oder 3 ml (75 cm²) Trypsin/EDTA für 3-5 min inkubiert. Sobald sich die Zellen vom Flaschenboden abgelöst hatten, wurde frisches Medium zugegeben und die Zellen sorgfältig resuspendiert. Für die Weiterkultivierung wurden die Zellen wie in Tabelle 2.1 angegeben in eine neue Kulturflasche umgesetzt, so dass diese nach drei bis vier Tagen wieder zu 90-100% konfluent waren. Für Experimente wurde ein Teil der Zellsuspension entnommen, auf die erforderliche Zellkonzentration verdünnt und ausgesät. Die Zellzahl wurde mit einem Casy[®]-Zellzähler (Roche Innovatis AG, Bielefeld) bestimmt.

Tabelle 2-1. Verwendete Kulturmedien und Verhältnisse bei der Umsetzung.

Zelllinie	Kulturmedium	Umsetzung
HEK 293	DMEM/Ham's F-12 (1:1)	1:10 oder 1:20
A375	DMEM	1:10 oder 1:20
Mel Im	DMEM	1:10 oder 1:20
IGR1	DMEM	1:3 oder 1:5
SK-Mel 28	DMEM	1:6
Ma-Mel-86	RPMI	1:5

2.2.4 Transiente Transfektion

Für Patch-Clamp- sowie Calcium-Imaging-Experimente wurden 35 mm-Kulturschalen (Nunc, Thermoscientific, Langenebold) verwendet. Für die Calcium-Imaging-Experimente wurde aus den Kulturschalen ein Loch ausgefräst und durch einen Glasboden ersetzt (Zentrale Forschungswerkstätten, Uniklinikum Jena). Die Zellen wurden in 2 ml Kulturmedium ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Transfektion erfolgte nach dem Prinzip der Lipofektion mit Roti[®]-Fect nach Herstellerangaben (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe). Die Mischung aus Kulturmedium (ohne Zusatz von FKS), DNA und Roti[®]-Fect (2 µl pro Kulturschale) wurde für 20 bis 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu den Zellen tropfenweise zugegeben. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert und konnten am nächsten Tag für entsprechende Messungen verwendet werden. Zur Identifikation transfizierter Zellen wurden diese mit einem weiteren Vektor, welcher für das CD8-Antigen kodiert (0,4 µg je Kulturschale) kotransfiziert und am Tag der Messung durch Zugabe von 4,5 µm-Dynabeads[®] (Dyna, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mikroskopisch sichtbar gemacht. Die Dynabeads sind mit anti-CD8-Antikörpern beschichtet und binden über diese an das CD8-Antigen (Jurman et al., 1994).

2.2.5 Proliferationsassay (MTT-Assay)

Die Durchführung erfolgte mit einem *Cell Proliferation Kit I (MTT)* von Roche (Basel, Schweiz). In eine Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) wurden je Vertiefung $3 \cdot 10^3$ Zellen in 0,1 ml Medium ausgesät und nach etwa 6 h die zu testenden Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen oder als Kontrolle DMSO (0,1%) zugegeben. Nach 36 h wurde das alte Medium durch frisches Medium inklusive Substanzen ausgetauscht. Nach 72 h erfolgte die Zugabe von 10 µl *MTT labeling reagent* je Vertiefung. Nach einer Inkubation von 4 h bei 37 °C wurden je Vertiefung 100 µl *Solubilization solution* hinzugefügt, über Nacht im Brutschrank inkubiert und am nächsten Morgen die Extinktion bei 595 nm in einem Tecan-Plattenleser (Modell Sunrise™, Tecan Group, Männedorf, Schweiz) gemessen. Es erfolgte pro unabhängigem Experiment und je eingesetzter Wirkstoffkonzentration eine Achtfachbestimmung. Die DMSO-Kontrolle wurde auf 100% festgelegt.

2.2.6 Migrationsassays

Transwell-Assay:

Zu 90% konfluente Mel Im-Zellen wurden für 24 h in FKS-freiem Medium „gehungert“ und am nächsten Tag in Mikrotiterplatten mit zwölf Kavitäten (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) ausgesät. Zur Untersuchung der Migrationsfähigkeit der Zellen in Gegenwart von verschiedenen Wirkstoffen enthielt jede Kavität einen Transwell-Einsatz (Membran mit 8 µm Porengröße, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg). Die Einsätze wurden vor dem Aussäen der Zellen mit Kollagen (*collagen calf skin*, Sigma-Aldrich; 50 µg/ml in PBS, autoklaviert) beschichtet, für eine Stunde im Brutschrank inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. In jeden Transwell-Einsatz (obere Kammer) wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen in 0,5 ml FKS-freiem Medium pipettiert. In die unteren Kammern wurden 1,5 ml FKS-haltiges Medium mit der entsprechenden Konzentration des Blockers oder als Kontrolle DMSO zugegeben. Je Blockerkonzentration erfolgte eine Doppelbestimmung. Die Platten wurden für 4 h im Brutschrank inkubiert und danach mit einer Färbelösung aus 0,5% Kristallviolett in PBS und 20% Methanol für 2 min fixiert und angefärbt. Die Kammern wurden dreimal mit deionisiertem Wasser gewaschen, nicht migrierte Zellen mittels Wattestäbchen entfernt und die Membranen aus den Transwell-Einsätzen mithilfe eines Skalpell isoliert. Die isolierten Membranen wurden jeweils auf einen Objektträger (76x26 mm, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) gelegt und darauf ein Deckgläschen (Ø 18 mm, Gerhard Menzel GmbH) mit DePeX (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) festgeklebt. Nach Trocknen über Nacht wurden je Membran drei bis sechs Ausschnitte (5-fache Vergrößerung) unter einem Lichtmikroskop (Axio Observer A1, Carl Zeiss AG, Oberkochen) fotografiert (AxioCam MRc5,

Carl Zeiss AG), die migrierten Zellen gezählt und addiert. Pro unabhängigem Experiment wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Wound healing-Assay:

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Zellmigration in Anwesenheit verschiedener Substanzen ist der *wound healing*-Assay. Hierzu wurden die Zellen in Mikrotiterplatten mit sechs Kavitäten (Greiner Bio-One) ausgesät und mit dem vorderen Ende einer 1 ml-Pipettenspitze ein schmaler Streifen in den konfluent bewachsenen Zellrasen jeder Kavität gekratzt. Das Medium wurde anschließend gewechselt, um abgelöste Zelle zu entfernen, und im Anschluss frisches Medium mit der jeweiligen Konzentration des Wirkstoffes zugegeben. Zu Beginn und nach 24 h wurden lichtmikroskopisch Fotos (wie beim Transwell-Assay) von diesen „Wunden“ gemacht und die Breite an fünf verschiedenen Stellen gemessen, der Mittelwert bestimmt und bezogen auf die Breite zu Beginn in Prozent angegeben.

2.2.7 Bestimmung der Cytotoxizität verwendeter Substanzen (LDH-Assay)

In eine Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten wurden je Vertiefung $1 \cdot 10^4$ Zellen in 0,1 ml Medium ausgesät und nach etwa 12 h die zu testenden Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen oder als Kontrolle DMSO (0,1%) zugegeben. Nach einer Inkubation von 4 h bei 37 °C wurden je Vertiefung 50 µl des Überstands abgenommen und in eine neue Mikrotiterplatte überführt. Katalysator und Farbstoff wurden nach Herstellerangaben (*Cytotoxicity Detection Kit*, Roche) angesetzt und hinzugefügt und die Platte abgedunkelt (Alufolie) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei 490 nm in einem Tecan-Plattenleser (Modell Sunrise™, Tecan Group) gemessen. Es wurde jeweils der Mittelwert aus acht Extinktionswerten für die verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Substanz und der beiden Kontrollwerte (unbehandelte Zellen und Triton X-100 behandelte Zellen) bestimmt und die prozentuale Cytotoxizität nach Herstellerprotokoll (siehe oben) berechnet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Arbeiten erfolgten nach etablierten Protokollen und Techniken (Sambrook und Green, 2012). Dabei wurden die in den Abschnitten 2.3.1 und 2.3.2 aufgeführten Materialien und Kits verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Abweichungen davon sind an entsprechender Stelle genannt.

2.3.1 Material für molekularbiologische Methoden

- TY-Medium

Bacto-Trypton	1% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	85,6 mM
Ampicillin	100 µg/ml
Zugabe von 1,5% (w/v) Agar für Festmedium	
- TAE (DNA-Gelelektrophorese)

Tris-Base	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM
- 10x Agarosegel-Ladepuffer

Harnstoff	3 M
Sucrose	30% (w/v)
EDTA	25 mM
Bromphenolblau	0,1% (w/v)
- Biozym LE Agarose (Biozym, Hessisch-Oldendorf)
- Ethidiumbromid (10 mg/ml, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Gel Loading Dye blue 6x (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)
- 1 kb/100 bp DNA ladder (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)
- Ambion Loading Buffer (Ambion, Austin, USA)

2.3.2 Erzeugung der dominant-negativen KCa3.1-Mutanten

Die zwei dominant-negativen KCa3.1-Konstrukte wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese erzeugt. Als Ausgangs-DNA wurde das Plasmid hIK-pcDNA3 verwendet, welches die Nukleotidsequenz für den humanen KCa3.1-Kanal beinhaltet. Die Nukleotide, welche für das Aminosäure-Motiv GYG des K⁺-Selektivitätsfilters codieren, wurden durch Nukleotide, welche für die Aminosäuren AAA (dnKCa3.1 AAA) beziehungsweise GLG (dnKCa3.1 GLG) codieren, ersetzt (Kuzhikandathil und Oxford, 2000; Barfod et al., 2007). Die Mutante dnKCa3.1 AAA wurde von Nicole Buttstädt erzeugt. Die ortsspezifische Mutagenese zur Generierung der KCa3.1 GLG-Mutante wurde mit einem *Quik-Change II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent-Stratagene, Santa Clara, USA) unter Verwendung zweier überlappender Primer (Primer hIK_GLG_S, Nr. 2055: 5'-CTGACCATCGGCCTGGGTGACGTGGTG-3' und Primer hIK_GLG_A, Nr. 2056: 5'-CACCACGTCACCCAGGCCGATGGTCAG-3') durchgeführt. Die PCR-Reaktion erfolgte mit einem VWR UnoCycler (VWR, Leuven, Belgien) und dem in Tab. 2-2 angegebenen PCR-Programm. Nach dem Verdau mit *DpnI* erfolgte die Analyse der PCR-Produkte auf einem 0,8%-Agarosegel. Anschließend erfolgte die Transformation von *E. coli* XL1 mit den PCR-Produkten. Zur Präparation der Plasmid-DNA wurde ein *PureYieldTM Plasmid System* (Promega GmbH, Mannheim) verwendet und laut Herstellerprotokoll vorgegangen. Zur

Identifikation korrekter Klone wurden diese per Sequenzierung (GATC Biotech AG, Konstanz) überprüft, ein geeigneter Klon ausgewählt und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Tabelle 2-2. PCR-Reaktion.

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	95 °C	30 s	
Denaturierung	95 °C	30 s	} 18Zyklen
Annealing	55 °C	1 min	
Elongation	68 °C	14 min	
Finale Elongation	68 °C	10 min	

2.3.3 Quantitative *real-time* PCR

Zur Untersuchung der Transkription verschiedener Gene in den verwendeten Zelllinien, wurde der mRNA-Gehalt mittels quantitativer *real-time* PCR bestimmt. Die Zellen wurden wie unter Abschnitt 2.2.3 beschrieben kultiviert. Die RNA-Isolation aus den Zellen erfolgte mithilfe des *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) und die cDNA-Synthese mit einem *SuperScript III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen) in einem Thermocycler (Modell Tpersonal, Biometra, Göttingen). Die quantitative *real-time* PCR erfolgte mit *Maxima[®] SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)* (Fermentas) und den in Tabelle 2.3 genannten genspezifischen Primerpaaren. Die quantitative *real-time* PCR erfolgte mit einem Mastercycler realplex⁴ (Eppendorf, Hamburg).

Tabelle 2-3. Primer für quantitative *real-time* PCR.

Gen	Nukleotidsequenz	Hersteller
<i>ACTB</i>	HS_ACTB_1_SG	Qiagen
<i>TRPV1</i>	5'-GTACACACCTGATGGCAAGG-3' 5'-CTTCCAGTGTCTGCCTGAAA-3'	RealTimePrimers.com
<i>TRPV2</i>	HS_TRPV2_1_SG	Qiagen
<i>TRPV3</i>	HS_TRPV3_1_SG	Qiagen
<i>TRPV4</i>	HS_TRPV4_1_SG	Qiagen
<i>TRPV5</i>	5'-GAGCTTGTGGTCTCCTCTGA-3' 5'-CTGGAGGATGGTGATGTCTC-3'	RealTimePrimers.com
<i>TRPV6</i>	5'-ATGGTGATGCGGCTCATCAGTG-3' 5'-GTAGAAGTGGCCTAGCTCCTCG-3'	Eurofins-MWG
<i>TRPC1</i>	5'-TGGCAGAATCATTACACAC-3' 5'-TTCCAACCCTTCATACCAGA-3'	RealTimePrimers.com
<i>TRPC3</i>	5'-AAGTGAAGTCCGTTGTGCTC-3' 5'-TTTTGAACGAGCAAACCTCC-3'	RealTimePrimers.com
<i>TRPC4</i>	HS_TRPC4_2_SG	Qiagen

Gen	Nukleotidsequenz	Hersteller
TRPC5	5'-GAGGCCTGTTCTCAACGTGA-3' 5'-GTGCATGAGCAAGTCACAAG-3'	RealTimePrimers.com
TRPC6	5'-GACCCCTCTGATCCTCAAAT-3' 5'-AAAGGCCACAAACACCATAA-3'	RealTimePrimers.com
TRPC7	5'-TCTATGCCTACGACGAGGAC-3' 5'-AAGGAGTCTTTCCGCTGTTT-3'	RealTimePrimers.com
KCNN4 (KCa3.1)	HS_KCNN4_1_SG	Qiagen

Für alle TRP-Gene wurden mindestens zwei unabhängige Primerpaare getestet. Die oben aufgelisteten Primerpaare wurden letztlich für die quantitative Analyse eingesetzt. Wenn keine Nukleotidsequenz angegeben ist, dann wurde die vom Hersteller verwendete Bezeichnung für das Primerpaar aufgeführt. KCNN4 ist die Bezeichnung für den humanen KCa3.1-Kanal nach HGNC (*HUGO Gene Nomenclature Committee*).

2.4 Elektrophysiologische Methoden

2.4.1 Lösungen und Chemikalien für elektrophysiologische Messungen

- Elektrodenlösung (1 μM freies Ca^{2+})

KCl	130 mM
MgCl ₂	2 mM
CaCl ₂	9,3 mM
EGTA	10 mM
HEPES	10 mM
pH 7,4 (KOH)	

freies Ca^{2+} berechnet mit WEBMAXC STANDARD
(web.stanford.edu/~cpatton/webmaxcS.htm)
- Elektrodenlösung (Ca^{2+} -frei)

KCl	130 mM
MgCl ₂	2,56 mM
EGTA	10 mM
HEPES	10 mM
pH 7,4 (KOH)	
- Badlösung

KCl	5 mM
NaCl	155 mM
CaCl ₂	2 mM
HEPES	10 mM
pH 7,4 (NaOH)	

2.4.2 Patch-Clamp-Messungen in der Ganzzellkonfiguration

Für die Patch-Clamp-Experimente wurden Ag/AgCl-Elektroden verwendet. Die Elektrodenspitzen wurden aus Kimax-51-Glasröhrchen (Kimble Chase, Vineland, USA) mit Widerständen von 0,8 bis 1,5 M Ω unter Verwendung eines P-97 Flaming/Brown Mikropipettenziehgeräts (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) gefertigt, mittels einer L/M-CPZ 101 Heizstation (List-Medical) poliert und mit RTV (GE Bayer Silicones, Leverkusen) überzogen, um Kapazitäten ≤ 5 pF zu garantieren. Die für die Patch-Clamp-Messung verwendeten Zellen wurden in 35 mm-Kulturschalen wie unter Abschnitt 2.2.3 beschrieben kultiviert und direkt vor der Messung wurde das Kulturmedium durch die Badlösung ersetzt. Die Bewegung der Elektrodenspitzen an die ausgewählten Zellen heran erfolgte mithilfe eines Mikromanipulators MCP-200/ROE-200 (Sutter Instruments). Zur Einstellung des Verstärkers, der Pulsprotokolle und zur Datenaufnahme diente die Software PatchMaster (HEKA Elektronik, Lambrecht). Kaliumströme der zu untersuchenden Zellen wurden in der Ganzzellkonfiguration (Hamill et al., 1981) bei Raumtemperatur und mithilfe eines EPC-10 Verstärkers (HEKA Elektronik) aufgezeichnet. Die Ganzzellkonfiguration ermöglicht die Erfassung des Ionenstroms über die gesamte Zelle. Alle Experimente wurden bei einem Haltepotential von -80 mV durchgeführt, um die Aktivierung spannungsabhängiger Kanäle zu Messbeginn zu unterbinden. Durch den Serienwiderstand entstehende Spannungsfehler wurden zu $\geq 70\%$ elektronisch kompensiert. Aufgrund der Ca^{2+} -sensitiven Eigenschaften von KCa3.1 erfolgten die Messungen mit einer Ca^{2+} -haltigen Elektrodenlösung, so dass intrazellulär gepuffert $1 \mu\text{M } \text{Ca}^{2+}$ vorlag (siehe Abschnitt 2.4.1). Der K^+ -Strom wurde durch Spannungsrampen von -100 bis 50 mV mit einer Dauer von 500 ms ausgelöst.

Abbildung 2-1 zeigt exemplarisch die unter den genannten Bedingungen aufgenommene Stromantwort einer Melanomzelle. Im negativen Spannungsbereich kann man eine deutlich lineare Stromantwort beobachten, welche charakteristisch für spannungsunabhängige Kanäle ist. Das gemessene Umkehrpotential für K^+ betrug etwa -60 bis -80 mV und lag somit nahe dem Nernst-Potential für K^+ . Um KCa3.1 in den zu untersuchenden Zellen eindeutig nachzuweisen, wurde der spezifische Blocker TRAM-34 eingesetzt. TRAM-34 ($\text{IC}_{50} = 20$ nM) zeigt eine 200- bis 500-fache Selektivität für KCa3.1-Kanäle gegenüber Kv-Kanälen und eine 1000-fache gegenüber KCa1.1- und KCa2-Kanälen (Wulff et al., 2000). In den Experimenten wurden jeweils 200 nM TRAM-34, verdünnt in der Badlösung, eingesetzt. Für die Blockstudien wurden die Spannungsrampen alle 5 s appliziert und die Änderung der Stromstärke (nA) im Bereich -40 bis -25 mV verfolgt, um den jeweiligen Kanalblock zu bestimmen (Abb. 2-1 A; grau schraffierter Bereich). Der Zeitverlauf (Abb. 2-1 B) wurde mit einer einfach-exponentiellen Funktion angepasst:

$$I(t) = I_0 + I_1 \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{on}}}\right) \quad (1)$$

Dabei ist I der Verlauf der Stromstärke (nA) über die Zeit t , I_0 die Stromstärke vor Blockerapplikation, I_1 die Amplitudenänderung und τ_{on} die Zeitkonstante des Effekteintritts bis zum Gleichgewicht. Die Stromreduktion bezogen auf den Ausgangsstrom wurde in % als Mittelwert \pm SEM angegeben. Die Datenanalyse erfolgte mit FitMaster (HEKA Elektronik) und IgorPro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA).

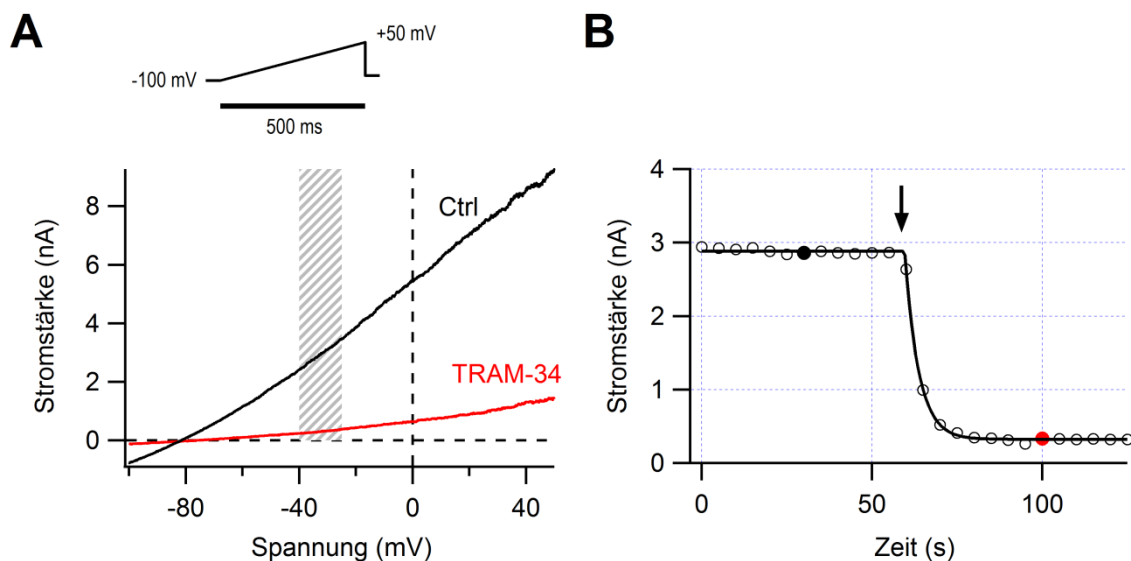


Abbildung 2-1: Funktionelle Analyse des KCa3.1-Kanals und Inhibition des KCa3.1-Stroms mit TRAM-34 in Melanomzellen. (A) Repräsentative Stromantworten in der Ganzzellkonfiguration, jeweils vor (Ctrl, schwarz) und nach Applikation (rot) des KCa3.1-Inhibitors TRAM-34 (200 nM). Die K^+ -Ströme wurden durch Spannungsrampen von -100 auf 50 mV innerhalb von 500 ms ausgelöst. Die Elektrodenlösung wurde auf intrazellulär $1 \mu\text{M}$ freies Ca^{2+} gepuffert. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die jeweiligen Nulllinien für Stromstärke und Spannung. Die schraffierte Fläche markiert den Spannungsbereich von -40 bis -25 mV zur Analyse der Änderung der Stromstärke bei Inhibitorzugabe. (B) Zeitverlauf der Stromstärke-Änderung nach Inhibitorzugabe. Aus wiederholten Spannungsrampen wurden die mittleren Stromstärken ermittelt wie in (A, markierter Spannungsbereich). Die beiden repräsentativen Stromspuren in (A), vor und nach TRAM-34-Zugabe, sind durch gefüllte Symbole angezeigt. Der Zeitverlauf des Kanalblocks wurde mit einer einfach-exponentiellen Funktion (durchgehende Linie) angepasst. Der Beginn der Applikation des KCa3.1-Blockers TRAM-34 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

2.4.3 Bestimmung des IC_{50} -Wertes des KCa3.1-Inhibitors TRAM-34 in HEK 293-Zellen

Für den von Wulff et al. entwickelten KCa3.1-Inhibitor wurde ein IC_{50} -Wert von 20 nM beschrieben (Wulff et al., 2000). Zur Bestimmung des IC_{50} wurde eine Dosis-Wirkungskurve aufgezeichnet. Dazu wurden HEK 293-Zellen mit KCa3.1 transfiziert (hIK-pcDNA3, Abschnitt 2.2.4) und die K^+ -Ströme mittels der Patch-Clamp-Technik in der Ganzzellkonfiguration bei verschiedenen TRAM-34 Konzentrationen gemessen. Dabei war zu beachten, dass die Verdünnungen von TRAM-34 in der Badlösung immer frisch angesetzt wurden, das heißt direkt vor jeder Applikation. Die Messungen erfolgten bei einem Haltepotential von -80 mV und die

Elektrodenlösung enthielt 1 μM freies Ca^{2+} . Der K^+ -Strom wurde durch Spannungsrampen von -100 bis 50 mV mit einer Dauer von 500 ms ausgelöst, welche alle 5 s appliziert wurden. Die mittlere Stromdichte (pA/pF) wurde während der extrazellulären Applikation von TRAM-34 im Spannungsbereich von -40 bis -25 mV registriert. Der jeweilige KCa3.1-Block wurde wie im letzten Abschnitt beschrieben als Mittelwert von n unabhängigen Experimenten berechnet. Der Block (%) wurde gegen die TRAM-34-Konzentration aufgetragen und durch Anpassen einer Hill-Funktion der IC_{50} -Wert bestimmt:

$$I_{\text{Block}} = B_{\text{min}} + \frac{B_{\text{max}} - B_{\text{min}}}{1 + \left(\frac{\text{IC}_{50}}{c}\right)^h} \quad (2)$$

Dabei sind I_{Block} die Strominhibierung, B_{max} der maximale Effekt beziehungsweise Block, B_{min} der minimale Effekt, c die Konzentration des Inhibitors, IC_{50} die halbmaximale effektive Konzentration und h der Hill-Koeffizient. Die Anpassung wurde so gewählt, dass die obere Grenze mit 100% und die untere Grenze mit 0% definiert wurden. Der Hill-Koeffizient h wurde bei einem Wert von 1 festgehalten.

Eigene Messungen an KCa3.1-transfizierten HEK 293-Zellen erbrachten mit $\text{IC}_{50} = 9 \pm 1$ nM ein ähnliches Ergebnis wie bei Wulff et al. (Wulff et al., 2000). Die dazugehörige Konzentrations-Wirkungs-Beziehung bei den verschiedenen TRAM-34 Konzentrationen ist in Abbildung 2-2 dargestellt.

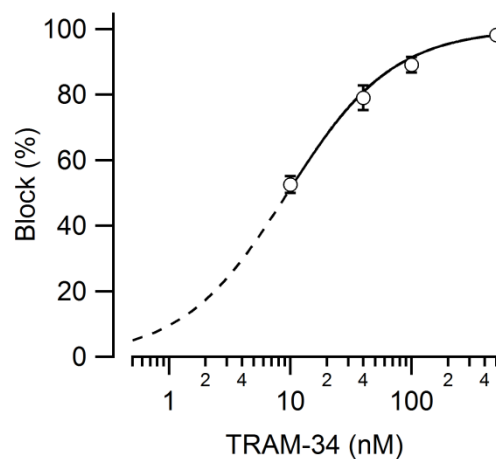


Abbildung 2-2: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von TRAM-34, bestimmt in KCa3.1-transfizierten HEK 293-Zellen. Mittels der Patch-Clamp-Technik wurden in der Ganzzellkonfiguration KCa3.1-Ströme in KCa3.1-transfizierten HEK 293-Zellen vor und nach der Applikation verschiedener Konzentrationen an TRAM-34 gemessen und im Spannungsbereich von -40 bis -25 mV die mittlere Stromreduktion (Block in % als Mittelwert \pm SEM) bestimmt. Für TRAM-34 ergab sich durch Anpassung einer Hill-Funktion ein IC_{50} -Wert von 9 ± 1 nM.

2.5 Calcium-Imaging-Methode

2.5.1 Lösungen und Chemikalien für das Calcium-Imaging

- HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*):

2 mM Ca^{2+} -HBSS

NaCl	142 mM
KCl	5,6 mM
MgCl_2	1 mM
CaCl_2	2 mM
Na_2HPO_4	0,34 mM
KH_2PO_4	0,44 mM
NaHCO_3	4,2 mM
HEPES	10 mM
Glucose	5,6 mM
pH 7,4 (NaOH)	

Ca^{2+} -freies HBSS (statt 2 mM CaCl_2 wurde 2 mM EGTA zugesetzt)

- Kalibrierungslösungen
(Berechnung der freien Ca^{2+} -Konzentrationen mit WEBMAXC STANDARD (web.stanford.edu/~cpatton/webmaxcS.htm); bei Zugabe von 100 μM Fura-2 unter Annahme eines K_D -Wertes von 220 nM und mit ≈ 2 mM freiem Mg^{2+})

0 μM freies Ca^{2+}

KCl	130 mM
MgCl_2	3,4 mM
EGTA	10 mM
HEPES	10 mM
pH 7,4 (KOH)	

0,17 μM freies Ca^{2+}

KCl	130 mM
MgCl_2	2 mM
CaCl_2	6,8 mM
EGTA	10 mM
HEPES	10 mM
pH 7,4 (KOH)	

90 μM freies Ca^{2+}

KCl	130 mM
MgCl_2	7,72 mM
CaCl_2	4,14 mM
HEDTA	10 mM
HEPES	10 mM
pH 7,4 (KOH)	

2.5.2 Messprinzip der Calcium-Imaging-Methode mit Fura-2

Ca^{2+} -Indikatoren binden reversibel freies Ca^{2+} und beinhalten ein Fluorophor, welches nach der Bindung von Ca^{2+} seine spektroskopischen Eigenschaften ändert. Im Fall von Fura-2 verschiebt

sich nach Ca^{2+} -Bindung das Anregungsmaximum. Das Emissionsmaximum liegt bei 510 nm. Während bei Ca^{2+} -freier Lösung das Anregungsmaximum von Fura-2 bei 365 nm liegt, verschiebt es sich mit steigender Ca^{2+} -Konzentrationen zu 340 nm (Abb. 2-3). Diese Eigenschaft ermöglicht eine ratiometrisch-fluorimetrische Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentration durch Messung der Fluoreszenzintensitäten nach Anregung durch zwei verschiedene Wellenlängen. Das heißt, dass eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität nach Anregung von Fura-2 mit 340 nm, aber zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 380 nm führt. Da die gemessenen Intensitäten bei den beiden Wellenlängen nicht in gleichem Maße zu- oder abnehmen, kann jedem F340/F380-Quotient nach Kalibrierung eine eigene Ca^{2+} -Konzentration zugeordnet werden. Der Vorteil ratiometrischer Messungen besteht darin, dass diese weitestgehend unabhängig von der Indikatorkonzentration, Zelldicke und dem Ausbleichen des Fluorophors sind.

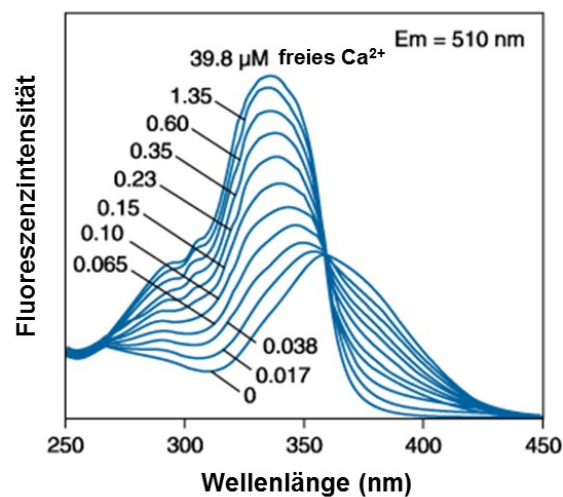


Abbildung 2-3: Anregungsspektrum von Fura-2. Dargestellt ist die Fluoreszenz bei 510 nm in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen (Abbildung modifiziert und entnommen aus www.lifetechnologies.com).

Fura-2 ist nicht membranpermeabel, daher wurden für eine Beladung von Zellen die Carboxylgruppen mit einem Acetoxymethylester maskiert (Grynkiewicz et al., 1985). Das so modifizierte Fura-2 AM kann die Zellmembran passieren und in alle Zellkompartimente diffundieren. Die im Cytosol vorkommenden unspezifischen Esterasen setzen durch Abspaltung der Acetoxymethylgruppen Ca^{2+} -bindendes Fura-2 wieder frei, welches dann in den Zellen verbleibt.

2.5.3 Beladung der Zellen mit Fura-2 AM und Ca^{2+} -Messungen an Zellen

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben kultiviert und in 35 mm-Kulturschalen mit Glasboden in 2 ml DMEM/10% FKS ausgesät. Zur bildgebenden Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) wurden die Zellen mit 4 μM Fura-2 AM (Sigma-Aldrich) als

Ca²⁺-Indikator in DMEM/10% FKS für 40 min bei 37 °C beladen. Dies und alle weiteren Arbeiten erfolgten unter Lichtausschluss, um das Ausbleichen des Farbstoffes zu minimieren. Nach der Beladung mit Fura-2 wurden die Zellen vor der Messung mehrfach mit 2 mM Ca²⁺-HBSS gewaschen. Durch nachträgliche Ausschleusung, beispielsweise über *multi-drug resistance* Transporter (MDR) ist es möglich, dass Farbstoff auch wieder nach außen gelangt. Um Messartefakte durch extrazelluläres Fura-2 zu verhindern, wurden die Zellen während der Messungen permanent mit HBSS-Puffer gespült (3 ml/min). Die Anregung von Fura-2 erfolgte abwechselnd bei 340 nm und 380 nm. Dazu wurde polychromatisches Licht einer Xenonlampe (Ushio, Japan) über einen Monochromator gelenkt (Polychrome II, TILL Photonics, Gräfelfing). Die Zellen wurden über einem Inversmikroskop (Axiovert 100, Carl Zeiss AG) mit einem 20x-Objektiv (Neofluar, Carl Zeiss AG) installiert. Das Anregungslicht wurde über einen Kurzpassfilter „395 SP Clean-up“ (AHF analysentechnik AG, Tübingen) geleitet, von einem dichroischen Spiegel (DCLP410, TILL Photonics) reflektiert und zu den Zellen gelenkt. Das von der Probe emittierte Licht kann den dichroischen Spiegel passieren, wurde über einen Langpassfilter (LP470, TILL Photonics) gefiltert und mit einer gekühlten CCD-Kamera (IMAGO, pco, Kehlheim) aufgenommen. Die Software TILLvisION (TILL Photonics) wurde zur Einstellung der Parameter wie Belichtungszeit, Binning und zur Datenanalyse verwendet. Die Belichtungszeit betrug 100 ms und für eine optimale räumliche und zeitliche Auflösung wurde das Binning 2 gewählt. Bei beiden Anregungswellenlängen wurde jeweils die Hintergrundfluoreszenz bestimmt und zur Berechnung des F340/380-Quotienten von den gemessenen Fluoreszenzintensitäten abgezogen. Fluoreszenzbilder für die beiden Wellenlängen wurden mit einer Rate von 0,1 oder 1,0 Hz aufgenommen. Die Daten wurden exportiert und alle weiteren Auswertungen sowie Darstellungen erfolgten mit IgorPro (WaveMetrics).

2.5.4 Kalibrierung

Zur Bestimmung der freien Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]) wurde eine *in vivo*-Kalibrierung durchgeführt (Neher, 1989). Hierfür wurden HEK 293-Zellen verwendet und über die Patch-Clamp-Technik in Ganzzellkonfiguration (Abschnitt 2.4.2) mit Kalibrierungslösungen bekannter Ca²⁺-Konzentrationen (freies Ca²⁺: 0 µM; 0,17 µM und 90 µM, siehe Abschnitt 2.5.1) und 100 µM Fura-2 (*pentapotassium salt*, Sigma-Aldrich) befüllt. Die Zellen wurden während der Messungen mit 2 mM Ca²⁺-HBSS gespült. Für jede Kalibrierungslösung wurde der F340/F380-Quotient wie im letzten Abschnitt beschrieben bestimmt und die [Ca²⁺] nach Grynkiewicz und Neher (Grynkiewicz et al., 1985; Neher, 1995) berechnet. Dabei wurde ein K_D-Wert für Fura-2 von 220 nM und α=0,1 (Meyer et al., 1999) angenommen. Der minimale (R_{min})

und maximale (R_{\max}) F340/F380-Quotient wurde aus zehn Bestimmungen (je sechsfach) gemittelt und in die Formel eingesetzt:

$$[Ca^{2+}] = K_{\text{eff}} \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)}$$

K_{eff} , R_{\min} und R_{\max} sind Kalibrierungskonstanten.

$[Ca^{2+}]$ - freie Ca^{2+} -Konzentration

R_{\min} - gemessener F340/F380-Quotient bei 0 μM freiem Ca^{2+}

R_{\max} - gemessener F340/F380-Quotient bei 90 μM freiem Ca^{2+}

R - gemessener F340/F380-Quotient bei bekannter freier $[Ca^{2+}]$ (hier 0,17 μM)

K_{eff} - effektive Dissoziationskonstante von Fura-2

bestimmt nach Meyer et al. (Meyer et al., 1999) mit:

$$K_{\text{eff}} = K_D \frac{(R_{\max} + \infty)}{(R_{\min} + \infty)}$$

2.6 Statistik

Es wurden bei den Untersuchungen in dieser Arbeit mindestens zwei unabhängige Experimente (n = Anzahl der Einzelmessungen) durchgeführt. Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test ($n < 2000$) auf eine Normalverteilung überprüft (SPSS statistics 21.0, IBM). Bei Normalverteilung der Daten wurde der Mittelwert (arithmetisches Mittel) \pm SEM (*standard error of the mean*, Standardfehler des Mittelwerts) berechnet und die Signifikanz der Verschiedenheit von zwei Datenreihen über einen zweiseitigen t-Test bestimmt. Bei $P < 0,05$ wurden die Daten als signifikant verschieden betrachtet. Wenn die Daten nicht normalverteilt waren, wurde als Darstellung der Daten ein Box-Whisker-Plot gewählt und der Median \pm MAD (*median absolute deviation*, Median der absoluten Abweichung) berechnet. Zu vergleichende Datensätze wurden mit einem Mann-Whitney U-Test auf statistische Signifikanz geprüft. Bei $P < 0,05$ wurden die Daten als signifikant verschieden betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Elektrophysiologische Untersuchungen zum Nachweis von KCa3.1 in Melanomzellen

Kaliumkanäle sind bekannt für die Regulation des Membranpotentials in erregbaren Zellen wie Neuronen und Muskelzellen. Sie sind verantwortlich für die Repolarisation der Membran bei Aktionspotentialen und wirken generell der Erregbarkeit entgegen, indem sie zur Hyperpolarisation der Membran beitragen. Zudem wird seit einiger Zeit auch eine Rolle von Kaliumkanälen in der Tumorentstehung und -entwicklung vermutet (Pardo et al., 1999; Weaver et al., 2004; Schönherr, 2005; Hemmerlein et al., 2006; Spitzner et al., 2007; Sciacaluga et al., 2010). Wie schon einleitend beschrieben, kann die Proliferation von Melanomzelllinien durch Hemmung des Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanals KCa3.1 reduziert werden (Tajima et al., 2006). Daher sollten zusätzlich Melanomzelllinien auf die funktionelle Expression dieses Kanals hin untersucht werden. Besonderes Interesse galt dabei solchen Linien, die innerhalb des bundesweiten Forscherverbundes „*Melanoma Research Network*“ schon in Bezug auf Zelleigenschaften wie Proliferation, Migration und Apoptose untersucht worden sind, um eine mögliche Bedeutung des Kanals für diese Prozesse prüfen zu können.

3.1.1 KCa3.1-Ströme in Melanomzelllinien

In der Arbeitsgruppe waren neben Melanozyten und primären Kulturen aus kutanen Melanomen und aus Fernmetastasen vor allem die humanen Linien IGR1 und IGR39 auf mRNA und funktionelle Expression von KCa3.1 untersucht worden. Für die im Forscherverbund gut untersuchten Linien A375, Mel Im, Ma-Mel-86a und SK-Mel 28 lagen dagegen noch keine Daten zur Expression des Kanals vor. Zur Messung von Kaliumströmen wurden Zellen dieser Linien sowie vergleichend IGR1-Zellen mithilfe der Patch-Clamp-Technik in der Ganzzellkonfiguration analysiert. Dies ermöglicht die Erfassung des Ionenstroms über eine gesamte Zelle. Aufgrund der Ca^{2+} -sensitiven Eigenschaften von KCa3.1 erfolgten die Messungen mit einer Ca^{2+} -haltigen Elektrodenlösung, so dass intrazellulär gepuffert etwa 1 μM freies Ca^{2+} vorlag. Abbildung 3-1 zeigt repräsentative Stromantworten von einzelnen Zellen der untersuchten Melanomlinien. In allen Melanomlinien konnte ein K^{+} -Auswärtsstrom beobachtet werden. Das gemessene Umkehrpotential dieser Ströme betrug im Mittel zwischen -60 und -76 mV (Mittelwerte \pm SD für IGR1: $-75,9 \pm 6,1$ mV; Mel Im: $-68,3 \pm 7,4$ mV; A375: $-63,5 \pm 9,9$ mV; SK-Mel 28: $-59,5 \pm 6,7$ mV, Ma-Mel-86a: $-62,6 \pm 11,0$ mV; $n \geq 7$). Diese Werte lagen nahe dem theoretischen Gleichgewichtspotential für Kaliumionen (Nernst-Potential: -83 mV), waren aber stets etwas

weniger negativ. Diese Verschiebung kann auf kleinere, zusätzliche Stromkomponenten wie unselektive Leckströme oder auch Cl^- -Kanäle zurückzuführen sein.

Im negativen Spannungsbereich der Rampen konnte man stets eine annähernd lineare Stromantwort beobachten, welche charakteristisch für spannungsunabhängige Kanäle ist. Im positiven Spannungsbereich gab es je nach Zelllinie Abweichungen von dieser Linearität. Dies war zum Teil in A375-Zellen und besonders ausgeprägt in Ma-Mel-86a erkennbar (Abb. 3-1). Ein überproportional starker Anstieg des Stromes im positiven Spannungsbereich lässt auf spannungsabhängige K^+ -Ströme schließen, die erst in diesem Spannungsbereich öffnen und damit den Gesamtstrom erhöhen. Messungen ohne intrazelluläres Ca^{2+} zeigten zudem, dass es sich um einen Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanal handelt, da Ganzzellmessungen mit EGTA in der Elektrodenlösung in den untersuchten Melanomzellen jeweils sehr geringe Auswärtsströme mit Umkehrpotentialen zwischen -50 mV und -20 mV aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Um KCa3.1 -Ströme in den zu untersuchenden Zellen eindeutig nachzuweisen und ihren Anteil an der Stromamplitude einschätzen zu können, wurde der Inhibitor TRAM-34 ($\text{IC}_{50} = 9 \pm 1 \text{ nM}$; Methoden 2.4.3) eingesetzt, der als spezifischer Porenblocker für KCa3.1 beschrieben wurde. TRAM-34 zeigt eine 200- bis 500-fache Selektivität für KCa3.1 gegenüber Kv -Kanälen und eine 1000-fache gegenüber KCa1.1 - und KCa2 -Kanälen (Wulff et al., 2000). Um den jeweiligen Kanalblock zu bestimmen, wurde die Änderung der Stromamplituden im Bereich von -40 bis -25 mV verfolgt, also in einem Spannungsbereich, der wenig von spannungsaktivierten Kanälen beeinflusst wird (Methoden 2.4.2). Bei elektrophysiologischen Untersuchungen in der Ganzzellkonfiguration konnte in allen Melanomlinien bis auf SK-Mel 28 ein TRAM-34-sensitiver KCa3.1 -Strom nachgewiesen werden. Applikation von 100 nM TRAM-34 führte zu einer Reduktion des K^+ -Stroms um mindestens 54% . Repräsentative Stromantworten mit und ohne TRAM-34 für die untersuchten Melanomlinien sind in Abbildung 3-1 gezeigt.

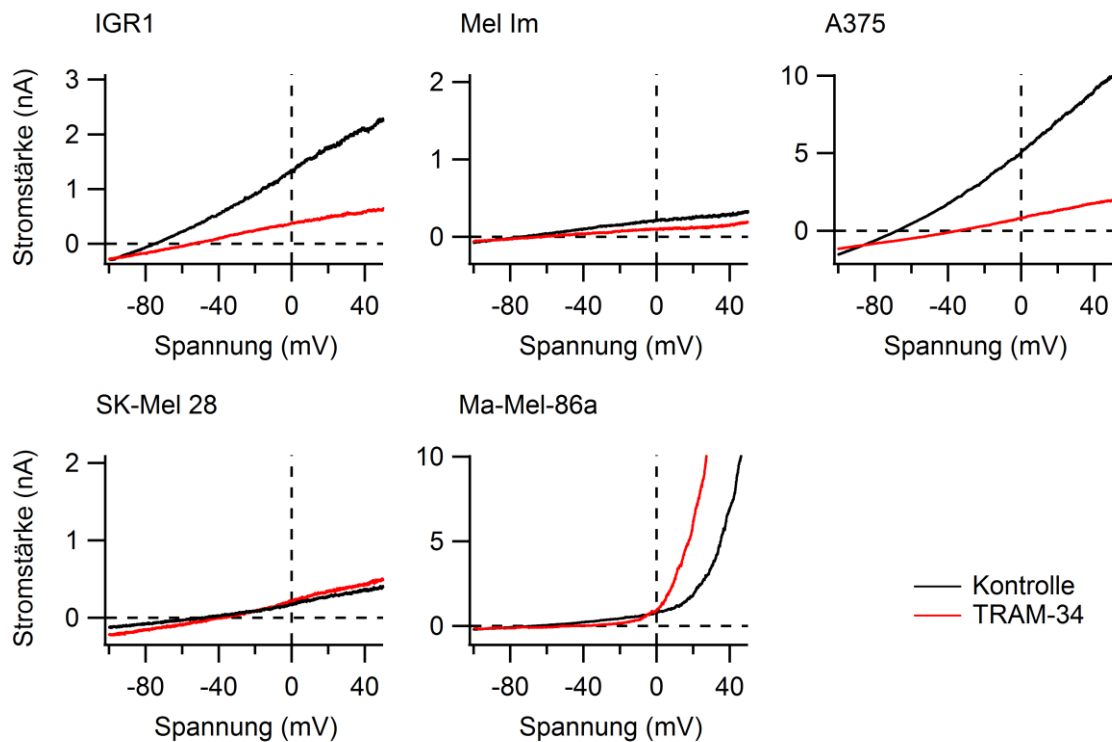


Abbildung 3-1: KCa3.1-Ströme in fünf verschiedenen Melanomlinien. Repräsentative Stromantworten in der Ganzzellkonfiguration, jeweils vor (schwarz) und nach Applikation (rot) des KCa3.1-Inhibitors TRAM-34 (100 nM). Das Auslösen der K^+ -Ströme erfolgte durch Spannungsrampen von -100 auf 50 mV innerhalb von 500 ms bei intrazellulär $1 \mu\text{M}$ freiem Ca^{2+} .

3.1.2 Vergleich von KCa3.1-Expression und Stromdichte

Parallel zu elektrophysiologischen Untersuchungen wurden die Melanomlinien mittels quantitativer *real-time* RT-PCR auf den Gehalt an KCa3.1-mRNA hin analysiert und mit dem in Kontroll-Melanozyten (gewonnen aus der Vorhaut gesunder Patienten und als Kontrolle verwendet) verglichen. Die Expressionsdaten wurden auf das Haushaltsgen β -Aktin normiert (Abb. 3-2). Aufgrund früherer Experimente ist in Abbildung 3-2 ein Schwellenwert (10^{-4} -fach über β -Aktin; gestrichelte Linie) für das mRNA-Signal angezeigt, ab dem erfahrungsgemäß auch eine KCa3.1-Expression elektrophysiologisch nachweisbar war. In allen Melanomlinien konnten Transkripte für KCa3.1 identifiziert werden, wobei die jeweilige Expression bis auf SK-Mel 28-Zellen deutlich über dem markierten Schwellenwert lag. Ergänzend zu den Expressionsdaten wurde die Stromdichte (pA/pF) mittels der Patch-Clamp-Technik in der Ganzzellkonfiguration ermittelt. Dazu wurde die Stromstärke (in pA) im Bereich von -40 bis -25 mV bestimmt und auf die Zellkapazität (in pF), als Maß der Zellgröße, normiert. In Melanozyten war die KCa3.1-Expression deutlich unter dem Schwellenwert und es konnte auch kein K^+ -Auswärtsstrom gemessen werden. Im Gegensatz zu den Kontroll-Melanozyten wurden in

Melanozyten aus Muttermalen (Nävi) vereinzelt K^+ -Ströme gemessen (S. Haun), diese Messungen wurden hier jedoch nicht einbezogen.

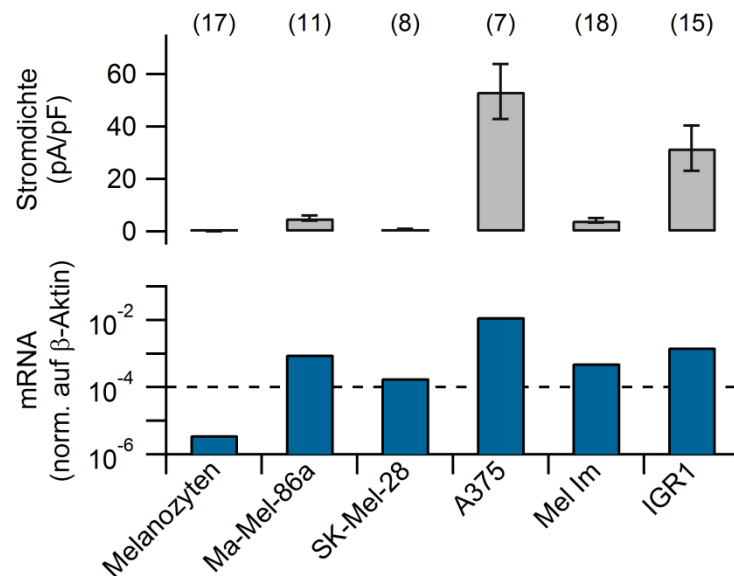


Abbildung 3-2: KCa3.1-Stromdichte und KCa3.1-Expressionsniveau in humanen Melanomlinien und Kontroll-Melanozyten. Gezeigt sind die mittlere Stromdichte (Mittelwert \pm SEM in pA/pF), bestimmt im Spannungsbereich von -40 bis -25 mV (oben) und die Expression der KCa3.1-mRNA, normiert auf β -Aktin (unten). Die gestrichelte Linie bei 10^{-4} kennzeichnet den Schwellenwert für die KCa3.1-mRNA, ab dem in früheren Untersuchungen ein KCa3.1-Strom messbar war. In den Kontroll-Melanozyten war kein K^+ -Strom messbar (S. Haun, unveröffentlicht). Die mRNA-Daten wurden von N. Buttstädt zur Verfügung gestellt.

Übereinstimmend mit der niedrigen Expression, konnte in SK-Mel 28 nur ein sehr geringer Auswärtsstrom beobachtet werden (SK-Mel 28: $0,7 \pm 0,2$ pA/pF; Abb. 3-2). Die anderen Melanomlinien zeigten einen geringen (Ma-Mel-86a: $5,0 \pm 1,0$ pA/pF; Mel Im: $4,1 \pm 0,9$ pA/pF) bis starken K^+ -Auswärtsstrom (IGR1: $31,7 \pm 8,7$ pA/pF; A375: $53,3 \pm 10,5$ pA/pF; Abb. 3-2). Auffallend war die Korrelation des KCa3.1-mRNA-Gehalts mit der gemessenen Stromdichte in den untersuchten Melanomlinien. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson für diese Verteilung lag bei $0,891$ ($p = 0,017$; Abb. 3-3). Die Expressions- und Stromdaten aus den Melanomlinien ergänzten sich gut mit bereits erhobenen Daten aus primären Tumoren und Metastasen (S. Haun, K. Schönherr). Es zeigte sich, dass KCa3.1 in Kontroll-Melanozyten weder elektrophysiologisch noch auf Expressionsebene nachgewiesen werden konnte, in vier von fünf der getesteten Melanomlinien war dagegen eine deutliche KCa3.1-Expression zu beobachten und mit dieser korrelierend auch ein messbarer KCa3.1-Strom. In primären Zellen aus Melanommetastasen und in Proben aus primären Tumoren der Haut war das Expressionsniveau von KCa3.1 noch höher als in den Melanomlinien und auch die mittlere Stromdichte in diesen Zellen war größer (Buttstädt et al., unveröffentlicht).

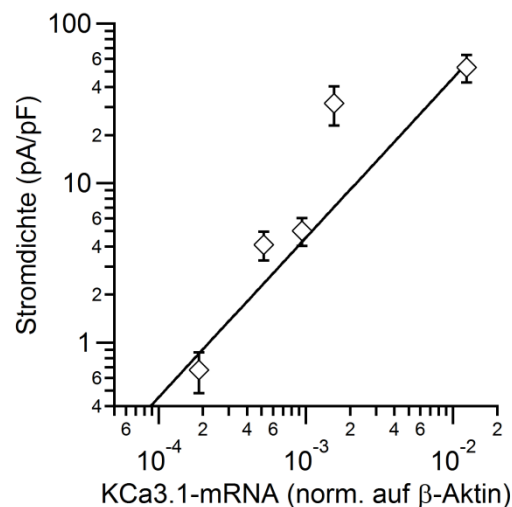


Abbildung 3-3: Korrelation der KCa3.1-mRNA humaner Melanomlinien mit der dazu bestimmten Stromdichte. Die elektrophysiologisch bestimmten mittleren Stromdichten aus Abb. 3-2 wurden gegen die dazugehörige KCa3.1-mRNA doppelt logarithmisch aufgetragen. Die schwarze Linie stellt die lineare Regression der Daten dar. Fehlerbalken sind SEM. Der Wert für die Melanozyten ist nicht abgebildet, da in diesen Zellen ein KCa3.1-Strom elektrophysiologisch nicht nachweisbar war.

Für die Untersuchung eines möglichen Einflusses von KCa3.1 auf die Ca^{2+} -Homöostase in Melanomzellen und damit verbundene Prozesse wie die Migration und die Proliferation wurde der Fokus dieser Arbeit auf die Melanomlinien A375, IGR1 und Mel Im gelegt, da diese einen elektrophysiologisch nachweisbaren KCa3.1-Strom aufwiesen und sie im Forscherverbund „*Melanoma Research Network*“ auch für weitere Studien verwendet wurden.

3.1.3 Einfluss des KCa3.1-Inhibitors TRAM-34 auf die MIA-Sekretion in Melanomzellen

Frühere Ergebnisse innerhalb der Arbeitsgruppe zeigten, dass der Block von KCa3.1 mit TRAM-34 zu einer signifikanten Verringerung der Migration von Melanomzellen führte (N. Buttstädt, persönliche Mitteilung). In Zusammenarbeit mit Forschern der Universität Regensburg wurde nun untersucht, ob der Einfluss von KCa3.1 auf die Migration im Zusammenhang mit der Ca^{2+} -abhängigen Sekretion des Proteins MIA stehen könnte. Die Sekretion des MIA-Proteins besonders am hinteren Zellende begünstigt das Ablösen der Zellen während der Migration (Bosserhoff et al., 2003; Poser et al., 2004).

Da sich bei der Applikation von TRAM-34 während elektrophysiologischer Untersuchungen gezeigt hatte, dass die Substanz in wässriger Lösung nicht stabil ist und an Wirkung verliert, wurden Vorexperimente zur Stabilität von TRAM-34 durchgeführt, um eine Anwendung von TRAM-34 auch bei längeren Studien wie Migrations- und Sekretionsuntersuchungen zu gewährleisten. Dazu wurde die Stabilität beziehungsweise der verbleibende effektive Block von TRAM-34 in verschiedenen Lösungen beziehungsweise Kulturmedien sowie unter

Zellkulturbedingungen (das heißt Zugabe von Kulturmedien mit fötalem Kälberserum und Inkubation bei 37 °C in Anwesenheit von HEK 293-Zellen) über mehrere Stunden lang untersucht. Die Messungen und Auswertung erfolgten wie unter 2.4.2 (Methoden) beschrieben.

Es wurden zu Beginn des Experiments jeweils 10 µM TRAM-34 in den entsprechenden Lösungen angesetzt. Die angesetzten Lösungen wurden anschließend über einen längeren Zeitraum inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten eine Probe entnommen, mit Badlösung auf eine theoretische Konzentration von 100 nM verdünnt und ein erneuter elektrophysiologischer Blocktest durchgeführt. Bei einer Konzentration von 100 nM wurde zu Beginn des Experiments ein nahezu vollständiger Block erreicht ($94,8 \pm 2,1\%$; Abb. 3-4). Die Inkubation erfolgte in der Badlösung, in verschiedenen Kulturmedien (DMEM, DMEM/F-12) mit und ohne FKS (fötales Kälberserum) sowie in Gegenwart von HEK 293-Zellen. In wässriger Lösung (Badlösung, DMEM ohne FKS) nahm der effektive Block von TRAM-34 mit der Zeit deutlich ab. Der Block sank nach 24 h im Mittel auf etwa 50% des Blocks zu Beginn des Experiments, nach 48 h waren es nur noch knapp 40% ($\tau = 57,7 \pm 5,8$ h; Abb. 3-4). In Medium mit FKS beziehungsweise unter Zellkulturbedingungen blieb der effektive Block dagegen konstant. Die Zugabe von FKS zum Kulturmedium scheint die Aktivität von TRAM-34 zu stabilisieren.

Unter Zellkulturbedingungen bleibt also die Wirkung von TRAM-34 erhalten und die Substanz kann demnach in Migrations- oder Proliferationsstudien über mehrere Tage und ohne Mediumwechsel verwendet werden.

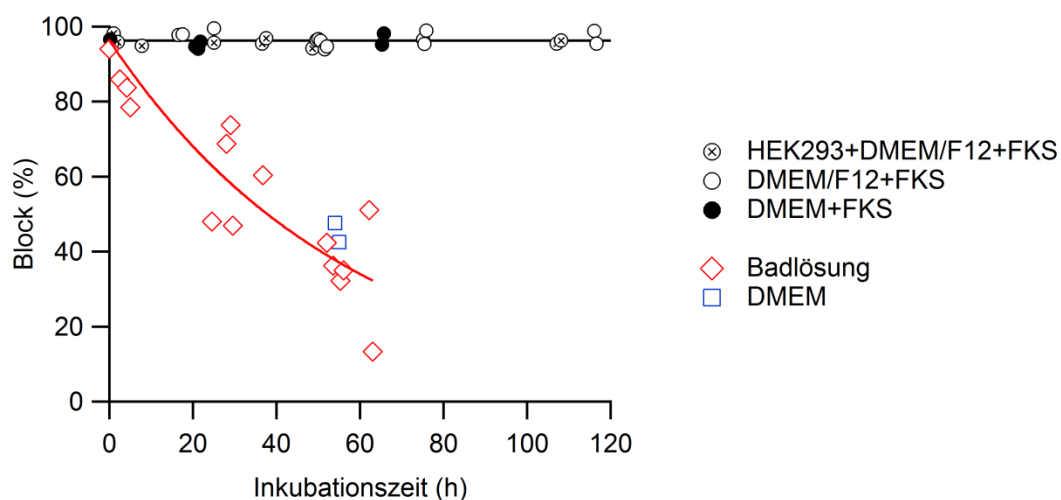


Abbildung 3-4: Stabilität von TRAM-34 in verschiedenen Lösungen, gemessen in KCa3.1-transfizierten HEK 293-Zellen. Inkubation des KCa3.1-Inhibitors TRAM-34 in verschiedenen Lösungen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und der jeweilige effektive Block (%) durch extrazelluläre Applikation in KCa3.1-transfizierten HEK 293-Zellen mittels Patch-Clamp-Messungen bestimmt. Legende rechts, von oben nach unten: Inkubation von TRAM-34 mit kultivierten HEK 293-Zellen in Medium DMEM/Ham's F-12 und 10% FKS (fötales Kälberserum); in Medium DMEM/Ham's F-12 und 10% FKS; in Medium DMEM und 10% FKS; in Badlösung sowie in Medium DMEM (ohne FKS).

Im Folgenden wurde der Einfluss von TRAM-34 auf die MIA-Sekretion in den Melanomlinien Mel Im und Mel Ju untersucht. Die pharmakologische Inhibition von KCa3.1 führte in beiden Melanomlinien zu einer signifikanten Abnahme der MIA-Sekretion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 3-5).

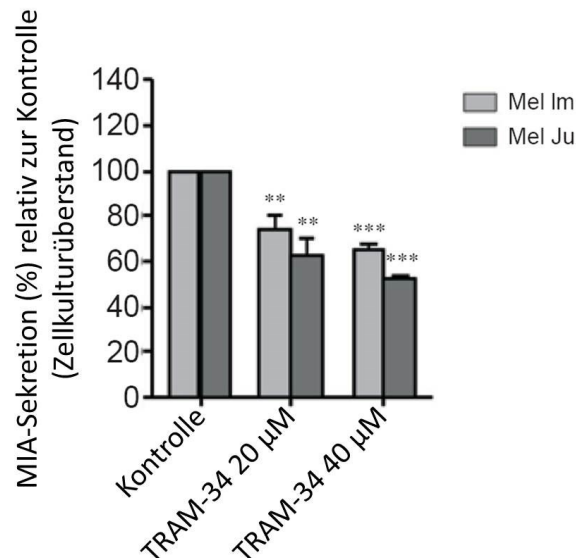


Abbildung 3-5: Einfluss des KCa3.1-Inhibitors TRAM-34 auf die MIA-Sekretion in den Melanomlinien Mel Im und Mel Ju. Zellen der Linien Mel Im und Mel Ju wurden mit 20 µM oder 40 µM TRAM-34 für 8 h inkubiert und anschließend die Sekretion des MIA-Proteins bestimmt. Unabhängiger Zweistichproben-t-Test, ** P < 0,01; *** P < 0,001. Abbildung modifiziert und entnommen aus Schmidt et al. (2010).

3.1.4 Erzeugung und Validierung von dominant-negativen Expressionskonstrukten des KCa3.1-Kanals

Neben TRAM-34 als pharmakologisches Werkzeug besteht die Möglichkeit, die Bildung funktioneller KCa3.1-Kanäle zu verhindern. Zu diesem Zweck wurden dominant-negative Mutanten des Kaliumkanals erzeugt (Methoden 2.3.2). Bei diesen Kanal-Konstrukten wurden die Nukleotide, welche für das Aminosäure-Motiv GYG des K⁺-Selektivitätsfilters codieren, mittels ortsspezifischer Mutagenese durch die Nukleotide, welche für die Aminosäuren AAA (dnKCa3.1 AAA) beziehungsweise GLG (dnKCa3.1 Y253L) codieren, ersetzt (Kuzhikandathil und Oxford, 2000; Barfod et al., 2007). Beim Zusammenlagern der dominant-negativen Kanaluntereinheiten mit Untereinheiten des Wildtyps sollten dabei nicht-funktionelle KCa3.1-Kanäle entstehen.

Zur Überprüfung der dominant-negativen Aktivität der KCa3.1-Mutanten wurden HEK 293-Zellen mit dem Wildtyp-Konstrukt allein sowie in Kombination mit steigender DNA-Konzentration einer der beiden dominant-negativen Mutanten transfiziert und wie unter 3.1.2. beschrieben der

Ca^{2+} -aktivierte K^{+} -Strom bestimmt. Beide dnKCa3.1-Konstrukte senkten bei einem 1:4-Verhältnis der DNA (Wildtyp/Mutante) den mittleren K^{+} -Strom mindestens 50-fach im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3-6, Tab. 3-1).

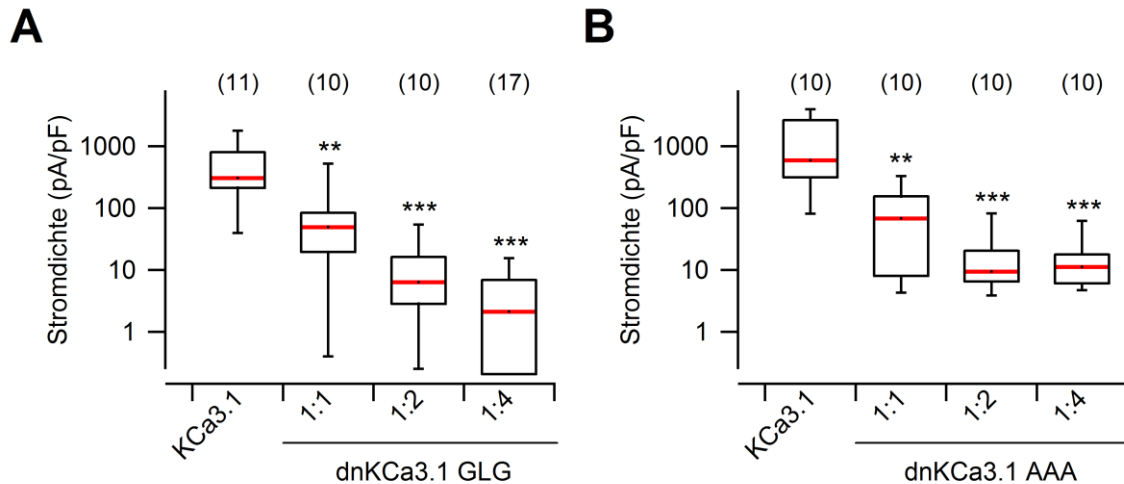


Abbildung 3-6: Überprüfung der dominant-negativen Aktivität der KCa3.1-Kanalmutanten dnKCa3.1 GLG und dnKCa3.1 AAA. HEK 293-Zellen wurden mit dem KCa3.1-Konstrukt allein transfiziert oder in Mischungen der Wildtyp-DNA mit steigenden Konzentrationen eines dominant-negativen Konstrukts **(A)** dnKCa3.1 GLG oder **(B)** dnKCa3.1 AAA. Mithilfe der Patch-Clamp-Technik wurde in der Ganzzellkonfiguration 24-48 h nach Transfektion die mittlere Stromdichte im Spannungsbereich von -40 bis -25 mV bestimmt. Die Medianwerte (rot) wurden aus je drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Die Anzahl der insgesamt gemessenen Zellen ist in Klammern angegeben. Mann-Whitney U-Test, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

HEK 293-Zellen, die mit leerem Vektor transfiziert wurden, wiesen dagegen keine Ca^{2+} -aktivierten K^{+} -Ströme auf (Daten nicht gezeigt). Der verbleibende KCa3.1-Strom in den mit dominant-negativen Kanalmutanten transfizierten HEK 293-Zellen war im Mittel etwas höher als theoretisch zu erwarten unter der Annahme, dass alle Kanaluntereinheiten rein zufällig und mit gleicher Effizienz in Tetramere eingebaut werden (Tab. 3-1). Bei Mischungsverhältnissen von 1:1 oder 1:2 (Wildtyp/Mutante) blieb die verbleibende Stromdichte bei beiden Mutanten bis etwa zweifach erhöht; bei einem 1:4-Verhältnis waren die gemessenen Stromdichten vierfach (dnKCa3.1 GLG) bis elffach (dnKCa3.1 AAA) höher als erwartet. Unabhängig davon bestätigten die Messungen aber klar die dominant-negativen Eigenschaften beider DNA-Konstrukte als Voraussetzung für eine Inhibition des Kanals KCa3.1.

Tabelle 3-1. Gemessene Stromdichten (Median \pm MAD) der HEK 293-Zellen aus Abb. 3-6.

	KCa3.1	KCa3.1 : dnKCa3.1 (1:1)	KCa3.1 : dnKCa3.1 (1:2)	KCa3.1 : dnKCa3.1 (1:4)
dnKCa3.1 GLG	308 \pm 284 pA/pF	49,4 \pm 26,0 pA/pF	6,4 \pm 3,6 pA/pF	2,1 \pm 2,8 pA/pF
erwartete Stromdichte		\approx 19,0 pA/pF (1/16)	\approx 3,8 pA/pF (1/81)	\approx 0,5 pA/pF (1/625)
dnKCa3.1 AAA	596 \pm 539 pA/pF	67,9 \pm 60,0 pA/pF	9,4 \pm 4,2 pA/pF	11,2 \pm 5,6 pA/pF
erwartete Stromdichte		\approx 37,0 pA/pF (1/16)	\approx 7,4 pA/pF (1/81)	\approx 0,9 pA/pF (1/625)

HEK 293-Zellen wurden mit Konstrukten für KCa3.1 und dnKCa3.1 GLG beziehungsweise dnKCa3.1 AAA transfiziert. Angegeben sind die gemessenen sowie die erwarteten Stromdichten für die jeweiligen Wildtyp/Mutante-Kombinationen. Die erwartete Stromdichte wurde unter der Annahme, dass alle Kanaluntereinheiten zufällig und mit gleicher Effizienz zu Tetrameren zusammengesetzt werden, berechnet. In Klammern ist die Wahrscheinlichkeit für die Zusammensetzung von funktionellen KCa3.1-Kanälen aus je vier Wildtyp-Kanaluntereinheiten beim entsprechenden Mischungsverhältnis angegeben.

Eine Transfektion der Zelllinie A375 mit dem Konstrukt dnKCa3.1 AAA bestätigte die dominant-negative Aktivität auch an Melanomzellen (Median \pm MAD: Kontrolle: 46,2 \pm 39,7 pA/pF; dnKCa3.1 AAA: 2,6 \pm 2,6 pA/pF; Abb. 3-7). Hier konnte eine deutliche Reduktion des endogenen K⁺-Stromes im Spannungsbereich von -40 bis -25 mV durch die dnKCa3.1-Mutante beobachtet werden (Mann-Whitney U-Test; P < 0,05; Abb. 3-7). Neben den beschriebenen Kriterien der Ca²⁺-Abhängigkeit und TRAM-34-Sensitivität lieferte dieses Experiment auch einen weiteren starken Hinweis darauf, dass der Strom im negativen Spannungsbereich überwiegend auf eine Aktivität von KCa3.1-Kanälen zurückzuführen ist.

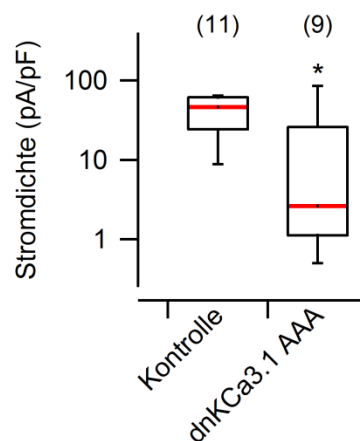


Abbildung 3-7: Einfluss der dominant-negativen KCa3.1-Kanalmutante dnKCa3.1 AAA auf die Stromdichte in der Melanomlinie A375. A375-Zellen wurden mit der Kontroll-DNA (leerer Vektor pcDNA3) oder mit dem Konstrukt für die Kanalmutante dnKCa3.1 AAA transfiziert und anschließend mittels der Patch-Clamp-Technik in der Ganzzellkonfiguration untersucht. Im Spannungsbereich von -40 bis -25 mV wurde die mittlere Stromdichte bestimmt. Die Medianwerte (rot) wurden aus je drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in Klammern angegeben. Mann-Whitney U-Test, * P < 0,05.

3.1.5 Einsatz der dominant-negativen KCa3.1-Kanalmutanten zur Unterdrückung der KCa3.1-Leitfähigkeit in Melanomzellen

Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen dominant-negativen Expressionsplasmide wurden anschließend in der bereits beschriebenen Studie zur MIA-Sekretion und zum Migrationsverhalten von Melanomzellen eingesetzt. Transfektionen der erzeugten dominant-negativen Mutanten dnKCa3.1 AAA und dnKCa3.1 GLG führten zu einer Abnahme der MIA-Sekretion in den Melanomlinien Mel Im und Mel Ju (Abb. 3-8).

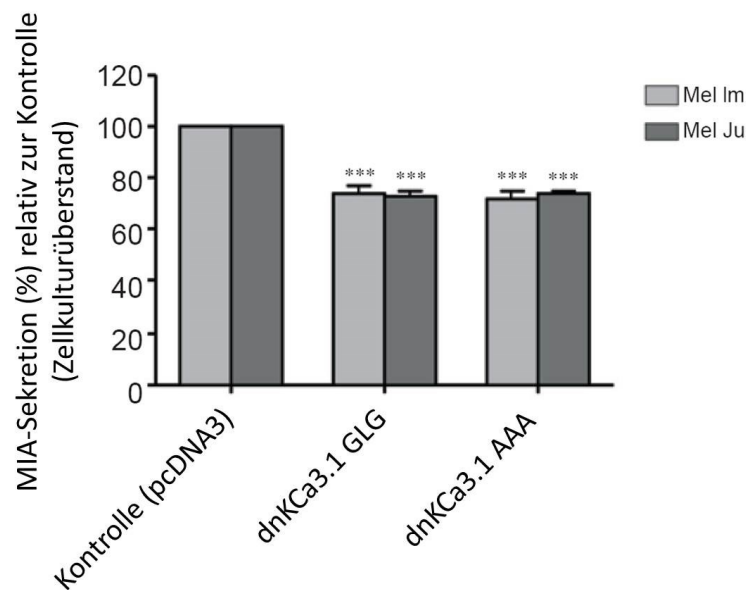


Abbildung 3-8: Einfluss der dominant-negativen KCa3.1-Kanalmutanten dnKCa3.1 GLG und dnKCa3.1 AAA auf die MIA-Sekretion in den Melanomlinien Mel Im und Mel Ju. Zellen der Linie Mel Im und Mel Ju wurden mit der Kontroll-DNA (leerer Vektor pcDNA3) oder mit den Konstrukten für die Kanalmutante dnKCa3.1 GLG und dnKCa3.1 AAA transfiziert und anschließend die Sekretion des MIA-Proteins bestimmt. Unabhängiger Zweistichproben-t-Test, *** $P < 0,001$. Abbildung modifiziert und entnommen aus Schmidt et al. (2010).

Dagegen konnte in HEK 293-Zellen, die natürlicherweise kein MIA-Protein sekretieren, eine höhere MIA-Sekretion beobachtet werden, wenn MIA mit KCa3.1 kotransfiziert wurde. Wenn zusätzlich zu diesen beiden Konstrukten die dominant-negative Mutante dnKCa3.1 AAA transfiziert wurde, sank die MIA-Sekretion dosisabhängig bis auf das Niveau der Zellen, die nur mit dem MIA-Konstrukt transfiziert waren (Abb. 3-9) (Schmidt et al., 2010). Mit dem hier nachgewiesenen Einfluss der KCa3.1-Leitfähigkeit auf die Sekretion des migrationsfördernden Proteins MIA konnte also ein molekularer Mechanismus identifiziert werden, über welchen KCa3.1 die Migration von Melanomzellen fördert. Da die MIA-Sekretion ein Ca^{2+} -abhängiger Prozess ist, folgten weitere Experimente, welche den Einfluss von KCa3.1 auf die Ca^{2+} -Homöostase genauer untersuchen sollten.

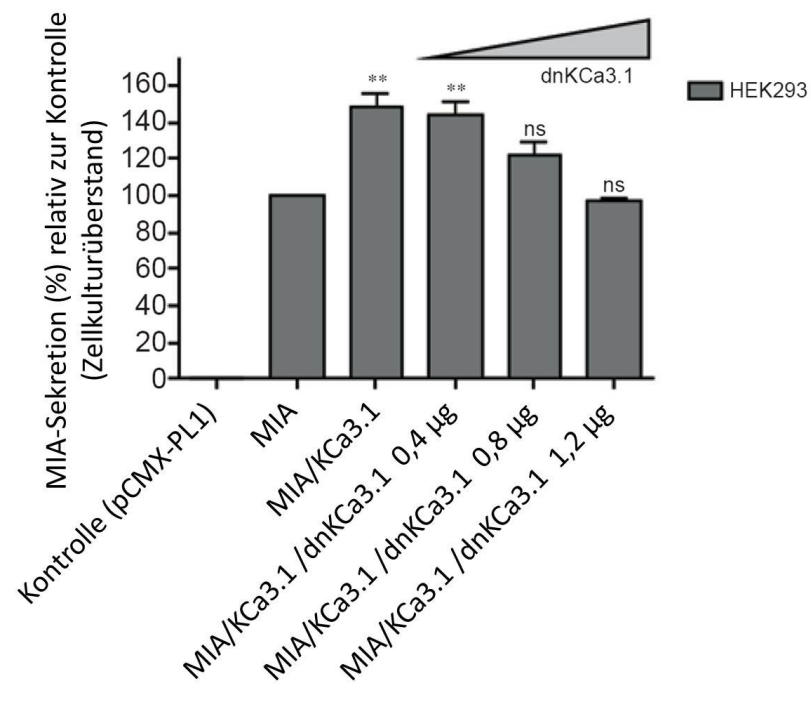


Abbildung 3-9: Einfluss der dominant-negativen KCa3.1-Kanalmutante dnKCa3.1 AAA auf die MIA-Sekretion in KCa3.1-transfizierten HEK 293-Zellen. HEK 293-Zellen wurden mit Konstrukten für MIA, KCa3.1 sowie in steigender Menge mit dem Konstrukt dnKCa3.1 AAA transfiziert und anschließend die Sekretion des MIA-Proteins bestimmt. Unabhängiger Zweistichproben-t-Test, ** $P < 0,01$. Abbildung modifiziert und entnommen aus Schmidt et al. (2010).

3.2 Ca^{2+} -Homöostase und Ca^{2+} -Kanäle in Melanomzellen

3.2.1 Einfluss von KCa3.1 auf den Ca^{2+} -Haushalt in ruhenden Melanomzellen

Die bisher beschriebenen Experimente haben gezeigt, dass die Inhibition des Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanals KCa3.1 wichtige Eigenschaften von Melanomzellen beeinflussen kann. Ein Zusammenhang zwischen KCa3.1 und der Zellproliferation ist auch früher schon beschrieben worden (Tajima et al., 2006). Bisher ist aber völlig unklar, welche molekularen Mechanismen dem Einfluss auf komplexe Vorgänge wie Zellproliferation, Migration oder die Sekretion von Proteinen zugrunde liegen. Da einerseits die genannten zellulären Prozesse unter anderem durch die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration moduliert werden können und andererseits der Kanal selber durch Ca^{2+} aktivierbar ist, liegt es nahe, dass KCa3.1 unter anderem durch Beeinflussung der Ca^{2+} -Homöostase auf diese Prozesse einwirken könnte. Eine häufig formulierte allgemeine Hypothese besagt, dass die Aktivität von Kaliumkanälen zum verstärkten Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle führt und damit onkogene Prozesse fördern kann (Oquadid-Ahidouch und Ahidouch, 2008; Pardo und Stühmer, 2014; Urrego et al., 2014). Tatsächlich haben Untersuchungen zu KCa3.1-Kanälen in Prostatakarzinomzellen gezeigt, dass die KCa3.1-Aktivität durch Absenkung des Membranpotentials indirekt zu verstärktem Einstrom von Ca^{2+} in diese Zellen führt (Lallet-Daher et al., 2009).

Die folgenden Experimente dienten der Messung der cytosolischen Calciumionenkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in verschiedenen Zelltypen, um zu prüfen, ob in ruhenden Zellen Unterschiede von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nachweisbar sind. Neben verschiedenen Melanomlinien wurden dabei auch HEK 293-Zellen untersucht. Alle drei Melanomlinien exprimieren funktionelle KCa3.1-Kanäle, während die Linie HEK 293 diesen Kanal nicht exprimiert. Die in den Melanomzelllinien bestimmten Konzentrationen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Median \pm MAD: A375: $114,2 \pm 29,4$ nM; Mel Im: $98,2 \pm 24,5$ nM; IGR1: $103,1 \pm 22,5$ nM) waren signifikant höher (Mann-Whitney U-Test; $P < 0,001$) als in HEK 293-Zellen ($62,4 \pm 13,8$ nM; Abb. 3-10 A). Zwischen den einzelnen Melanomzelllinien konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ festgestellt werden. Interessanterweise führte eine heterologe Expression von KCa3.1 in HEK 293-Zellen zu einer signifikant erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (HEK 293 mit hIK-pcDNA3: $115,5 \pm 33,5$ nM; HEK 293 mit Vektor pcDNA3: $86,9 \pm 18,2$ nM, Mann-Whitney U-Test; $P < 0,001$; Abb. 3-10 B). Die Darstellung der Daten als Box-Whisker-Plots in den Abbildungen 3-10 A und B macht deutlich, dass zwischen einzelnen Zellen jeder Linie eine deutliche Streuung der gemessenen Ca^{2+} -Konzentrationen vorkommt, wobei diese Varianz bei den Melanomlinien höher ist als bei HEK 293. Ein möglicher Effekt der Transfektion auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist nicht auszuschließen, da die bestimmte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in

transfizierten HEK 293-Zellen (Abb. 3-10 B) höher war als in den nicht-transfizierten HEK 293-Zellen (Abb. 3-10 A).

Neben einem Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ durch Expression von KCa3.1 in HEK 293-Zellen konnte zudem durch Inhibition von KCa3.1 eine Reduktion von $[Ca^{2+}]_i$ in der Melanomlinie Mel Im beobachtet werden. Dazu wurden der Badlösung 10 μ M des KCa3.1-Blockers TRAM-34 zugegeben und die Zellen damit für einige Minuten gespült. In Abbildung 3-10 C ist der Zeitverlauf für ein Experiment exemplarisch dargestellt. In weiteren Experimenten konnte bestätigt werden, dass alle Zellen mit einer Reduktion von $[Ca^{2+}]_i$ reagieren, wenn KCa3.1 inhibiert wird (Abb. 3-10 D). Die Senkung von $[Ca^{2+}]_i$ betrug für Mel Im-Zellen im Mittel $19,9 \pm 0,8\%$. Jedoch blieb bei Zugabe von TRAM-34 zu A375-Zellen $[Ca^{2+}]_i$ nahezu unverändert beziehungsweise war ein leichter Anstieg um $1,9 \pm 0,3\%$ zu verzeichnen (Abb. 3-10 E). Dagegen bewirkte die Applikation von TRAM-34 in HEK 293-Zellen eine Abnahme von $[Ca^{2+}]_i$. Diese Abnahme betrug durchschnittlich $16,7 \pm 0,8\%$ und war statistisch signifikant (Abhängiger Zweistichproben-t-Test; $P < 0,001$). Mehrmalige Anwendung von 0,1% DMSO zeigte dagegen keinen Einfluss auf den Ca^{2+} -Gehalt ruhender Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse aus Abbildung 3-10 B und D konnten bereits in einer Publikation von 2010 (Schmidt et al., Cell Research 20:1224) veröffentlicht werden und sind hier entsprechend angepasst und um weitere Experimente ergänzt worden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein zwingender Einfluss von KCa3.1 auf $[Ca^{2+}]_i$ in ruhenden Zellen nicht nachweisbar war. Die untersuchten Melanomlinien mit KCa3.1-Expression wiesen zwar erhöhtes $[Ca^{2+}]_i$ auf, die Applikation des Inhibitors TRAM-34 ergab aber keinen für alle Linien gültigen Beweis des kausalen Zusammenhanges.

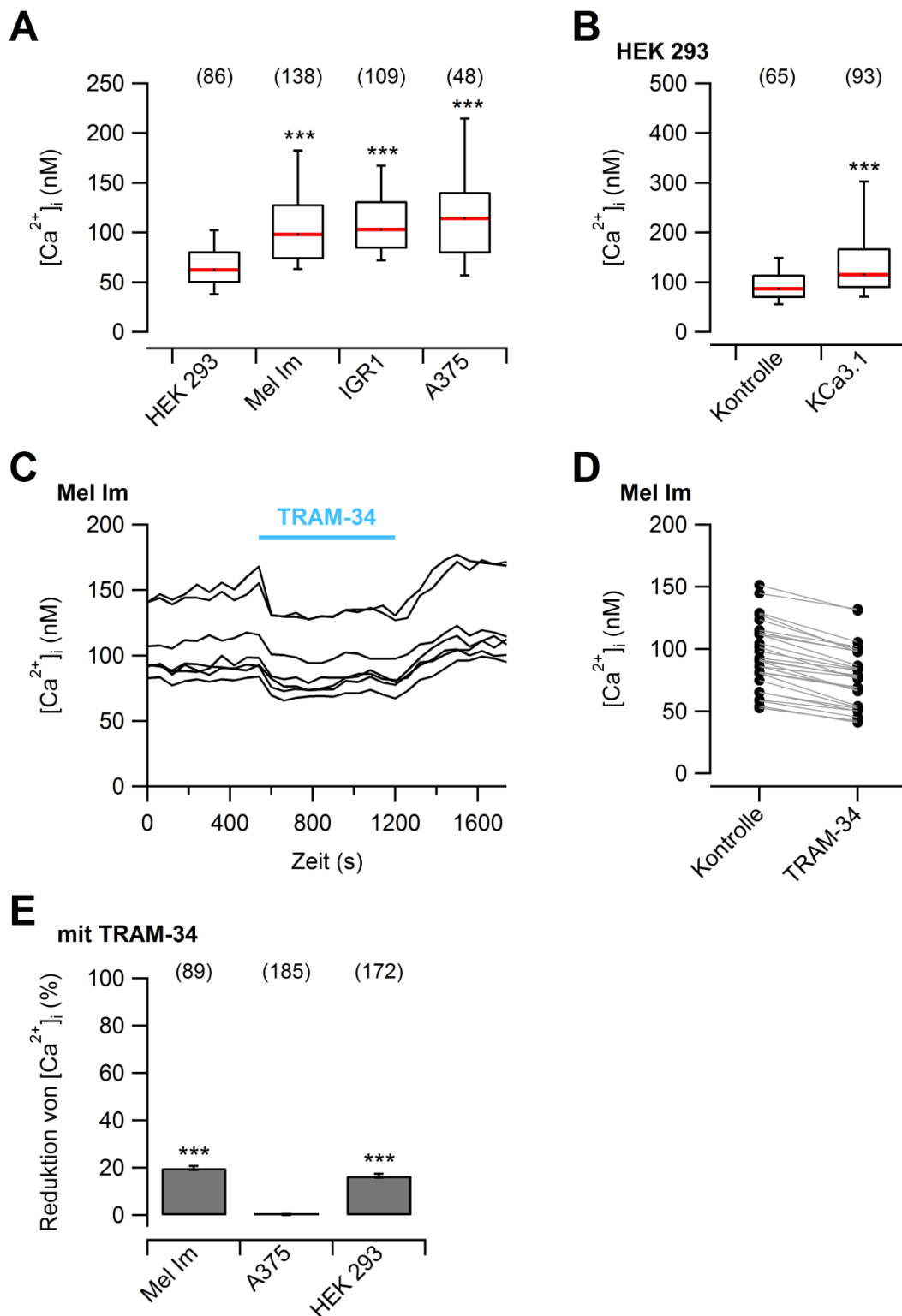


Abbildung 3-10: Einfluss von KCa3.1 und TRAM-34 auf die cytosolische Calciumionenkonzentration in Melanomzelllinien und in HEK 293-Zellen. Zur bildgebenden Messung der intrazellulären Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) wurden Zellen mit Fura-2 beladen und anschließend bei alternierender Anregung (340/380 nm) die Emission bei 510 nm bestimmt. $[Ca^{2+}]_i$ wurde aus dem F340/F380-Quotienten nach Grynkiewicz (Methoden 2.5.4) berechnet. Alle Messungen wurden in Gegenwart von 2 mM Ca^{2+} im extrazellulären Medium ohne Stimulation der Zellen durchgeführt. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist jeweils in Klammern angegeben. **(A)** Vergleich von $[Ca^{2+}]_i$ in drei

Melanomzelllinien und in HEK 293-Zellen. Medianwerte sind rot hervorgehoben, ermittelt aus mindestens zehn unabhängigen Experimenten. Mann-Whitney U-Test, *** $P < 0,001$. **(B)** $[Ca^{2+}]_i$ in HEK 293-Zellen die mit hIK-pcDNA3 (KCa3.1) transfiziert wurden im Vergleich zu Kontrolltransfektionen mit dem Vektor pcDNA3. Die Medianwerte (rot) wurden aus je vier unabhängigen Experimenten ermittelt. Mann-Whitney U-Test, *** $P < 0,001$. **(C)** Reduktion von $[Ca^{2+}]_i$ in Mel Im-Zellen nach extrazellulärer Applikation von 10 μM TRAM-34. Der Zeitverlauf von sieben Zellen ist exemplarisch dargestellt. **(D)** Individuelle Änderungen von $[Ca^{2+}]_i$ in Mel Im-Zellen nach Applikation von 10 μM TRAM-34 wie in (C), repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Die Punkte sind jeweils Mittelwerte aus zehn Einzelmessungen vor Applikation beziehungsweise nach Zugabe von TRAM-34. **(E)** Relative Reduktion von $[Ca^{2+}]_i$ durch TRAM-34 in den angegebenen Zelllinien. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei bis sieben unabhängigen Experimenten. Abhängiger Zweistichproben-t-Test, *** $P < 0,001$.

3.2.2 CRAC-Kanäle in Melanomzellen

Neben einer Beeinflussung von $[Ca^{2+}]_i$ in ruhenden Zellen könnten K^+ -Kanäle vor allem dann von Bedeutung für $[Ca^{2+}]_i$ sein, wenn die Zelle stimuliert wird und es zu verstärktem Ca^{2+} -Einstrom durch Ca^{2+} -permeable Kanäle kommt. Eine eingehendere Betrachtung des Ca^{2+} -Haushalts in Melanomzellen setzt daher zunächst eine bessere Kenntnis der vorhandenen Ca^{2+} -Kanäle voraus. Die eigenen Messungen mit Spannungsrampen oder depolarisierenden Rechteckpulsen hatten keine Hinweise auf spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle in Melanomzellen ergeben (nicht gezeigt). Dagegen treten in fast allen bekannten Zelltypen sogenannte CRAC-Kanäle (*Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels*) auf, die nicht spannungsgeschaltet sind. CRAC-Kanäle werden durch das Entleeren intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher aktiviert (Putney, 1986; Putney, 1990). Dies wird auch als *store-operated Ca²⁺ entry* oder SOCE bezeichnet. Eine KCa3.1-abhängige Verstärkung des Ca^{2+} -Einstroms über CRAC-Kanäle wurde bereits für humane Makrophagen beschrieben (Gao et al., 2010). Zudem trägt KCa3.1 zur Aufrechterhaltung des Ca^{2+} -Einstroms über CRAC-Kanäle in aktivierten T-Zellen bei und damit zur Proliferation und Cytokinproduktion dieser Zellen (Chandy et al., 2004).

Im Folgenden wurden Melanomzellen und vergleichend HEK 293-Zellen bezüglich ihrer Expression von CRAC-Kanälen untersucht. Zur Bildung funktioneller CRAC-Kanäle müssen porenbildende Untereinheiten in der Plasmamembran (ORAI) mit Ca^{2+} -messenden Untereinheiten (STIM) im endoplasmatischen Retikulum wechselwirken (Penna et al., 2008). Mittels quantitativer *real-time* RT-PCR wurde der mRNA-Gehalt der entsprechenden Gene (*ORAI1*, *ORAI2* und *ORAI3* sowie *STIM1* und *STIM2*) in HEK 293-Zellen und in drei verschiedenen Melanomlinien bestimmt. In Abbildung 3-11 sind die Ergebnisse der quantitativen *real-time* RT-PCR dargestellt. Als Haushaltsgen diente β -Aktin. Sowohl in HEK 293 als auch in den Melanomzellen konnten Transkripte der *ORAI*- und *STIM*-Gene identifiziert werden. Die Expression von *ORAI2* war durchgängig in allen Zellen nur gering ausgeprägt. Die mRNA-Level zeigten hingegen für *ORAI1* und *ORAI3* sowie *STIM1* und *STIM2* eine höhere Expression. Zwischen den verschiedenen Zelllinien waren keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich des Expressionsniveaus zu

verzeichnen. Nur in der Linie IGR1 war *STIM2* schwächer exprimiert als in den anderen Linien. Es ist bekannt, dass CRAC-Kanäle ubiquitär vorkommen (Gross et al., 2007; Wissenbach et al., 2007; Lewis, 2011), was sich in den hier erhobenen mRNA-Daten widerspiegelt.

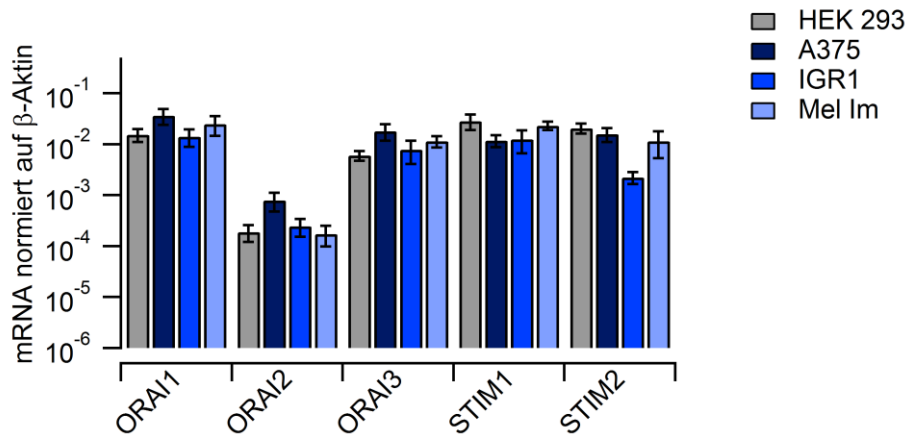


Abbildung 3-11: mRNA-Level für *ORAI1*, -2 und -3 sowie *STIM1* und *STIM2* in Melanomzelllinien und in HEK 293-Zellen. mRNA wurde aus HEK 293-Zellen und aus den Melanomlinien A375, IGR1 sowie Mel Im isoliert. Die Analyse erfolgte mittels quantitativer *real-time* RT-PCR. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus vier bis fünf unabhängigen Experimenten je Zelllinie. Die Daten wurden auf β -Aktin normiert.

Nachdem mRNA für die *ORAI*- und *STIM*-Gene in allen vier Zelllinien nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob die Kanäle auch funktionell aktiv sind. Dazu wurden die Ca^{2+} -Speicher der Zellen entleert, um einen speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom (*store-operated Ca^{2+} entry*, SOCE) auszulösen. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an eine ähnliche Arbeit mit LNCaP-Zellen (Skryma et al., 2000). Die Entleerung der Ca^{2+} -Speicher wurde mit Thapsigargin, einem Blocker der *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase* SERCA, ausgelöst. Durch den Block der SERCA-Pumpe kommt es zu einer Ca^{2+} -Verarmung im ER-Lumen, da Ca^{2+} nicht mehr in das ER transportiert werden kann, während es gleichzeitig über Ca^{2+} -Leckkanäle in das umgebende Cytosol verloren geht. Bei Ca^{2+} -Mangel im ER reagieren die STIM-Proteine mit einer Oligomerisierung, die die Öffnung der porenformenden Untereinheit ORAI in der Zellmembran nach sich zieht und schließlich zum Ca^{2+} -Einstrom von außen in die Zelle führt. Dieser Vorgang dient der Zelle dazu, die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher wieder aufzufüllen. Zur Inhibition von SOCE wurde die Substanz 2-APB eingesetzt. 2-APB wurde als CRAC-Kanalblocker beschrieben, hat dabei aber keine sehr hohe Selektivität (Bootman et al., 2002). Bei Konzentrationen zwischen 50 und 100 μM werden CRAC-Kanäle erfahrungsgemäß vollständig blockiert. Jedoch ist zu beachten, dass Konzentrationen unterhalb von 10 μM CRAC-Kanäle aktivieren können und höhere Konzentrationen an 2-APB auch zu einer Inhibition oder gar Aktivierung anderer Ca^{2+} -Kanäle wie TRP-Kanälen führen kann (Prakriya und Lewis, 2001).

Für diesen und auch für die nachfolgenden Versuche wurde die Ca^{2+} -Konzentration durch Aufzeichnung des F340/F380-Quotienten repräsentiert.

Es wurden zwei Melanomlinien (Mel Im und A375) ausgewählt, um die funktionelle Expression von CRAC-Kanälen zu überprüfen. Zu Beginn wurden die Zellen mit 2 mM Ca^{2+} -HBSS für wenige Minuten gespült und dabei der F340/F380-Quotient verfolgt, um eine spontane Reaktion der Zellen auszuschließen. Anschließend folgte die Zugabe von 1 μM Thapsigargin (TG) für ≈ 200 s in Ca^{2+} -freiem HBSS, welches die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER bewirkt (Takemura et al., 1989). Wie in Abb. 3-12 zu sehen ist, kam es wenige Sekunden nach der TG-Applikation zu einem vorübergehenden Anstieg des F340/F380-Quotienten und damit von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in beiden Zelllinien, welcher innerhalb von etwa 200 Sekunden nahezu auf den anfänglichen Wert zurückging. Anschließend wurde wieder zu HBSS mit 2 mM Ca^{2+} gewechselt. Aufgrund aktivierter CRAC-Kanäle kam es sofort zu einem starken Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen, welcher bei der Melanomlinie Mel Im mit einer höheren F340/F380-Amplitude und länger anhaltenden Plateauphase stärker ausgeprägt war als bei A375-Zellen (Mel Im: Abb. 3-12 A, links; A375: Abb. 3-12 B, links). Die Plateauphase kommt zustande, da sich durch die Änderung der Geschwindigkeiten von Ca^{2+} -Einstrom und Ca^{2+} -Ausstrom ein neues Gleichgewicht einstellt.

Vorexperimente in Mel Im-Zellen mit steigenden Konzentrationen an TG zeigten zudem, dass sich weder für das kumulierte Ca^{2+} -Signal der Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Speichern (Mittelwerte \pm SEM: 0,01 μM TG: $58,2 \pm 2,1$ AU $n=28$; 0,1 μM TG: $69,2 \pm 1,7$ AU $n=25$; 1 μM TG: $55,6 \pm 3,1$ AU $n=31$; Daten nicht gezeigt) noch für das kumulierte Ca^{2+} -Signal bei Ca^{2+} -Einstrom von außen (Mittelwerte \pm SEM: 0,1 μM TG: $452,8 \pm 25,0$ AU $n=33$; 0,5 μM TG: $514,8 \pm 14,5$ AU $n=40$; 1 μM TG: $563,8 \pm 12,3$ AU $n=51$; Daten nicht gezeigt) signifikant dosisabhängige Unterschiede ergaben. Aus diesen Gründen wurde eine Konzentration von 1 μM TG in allen folgenden Experimenten festgelegt. Die Berechnung des kumulierten Ca^{2+} -Signals erfolgte über einen Zeitraum von 100 s während der TG-Zugabe. Dazu wurde das Integral des F340/F380-Quotienten abzüglich des Grundlevels vor TG-Zugabe bestimmt. Das kumulierte Ca^{2+} -Signals wurde in AU (*arbitrary units*) angegeben.

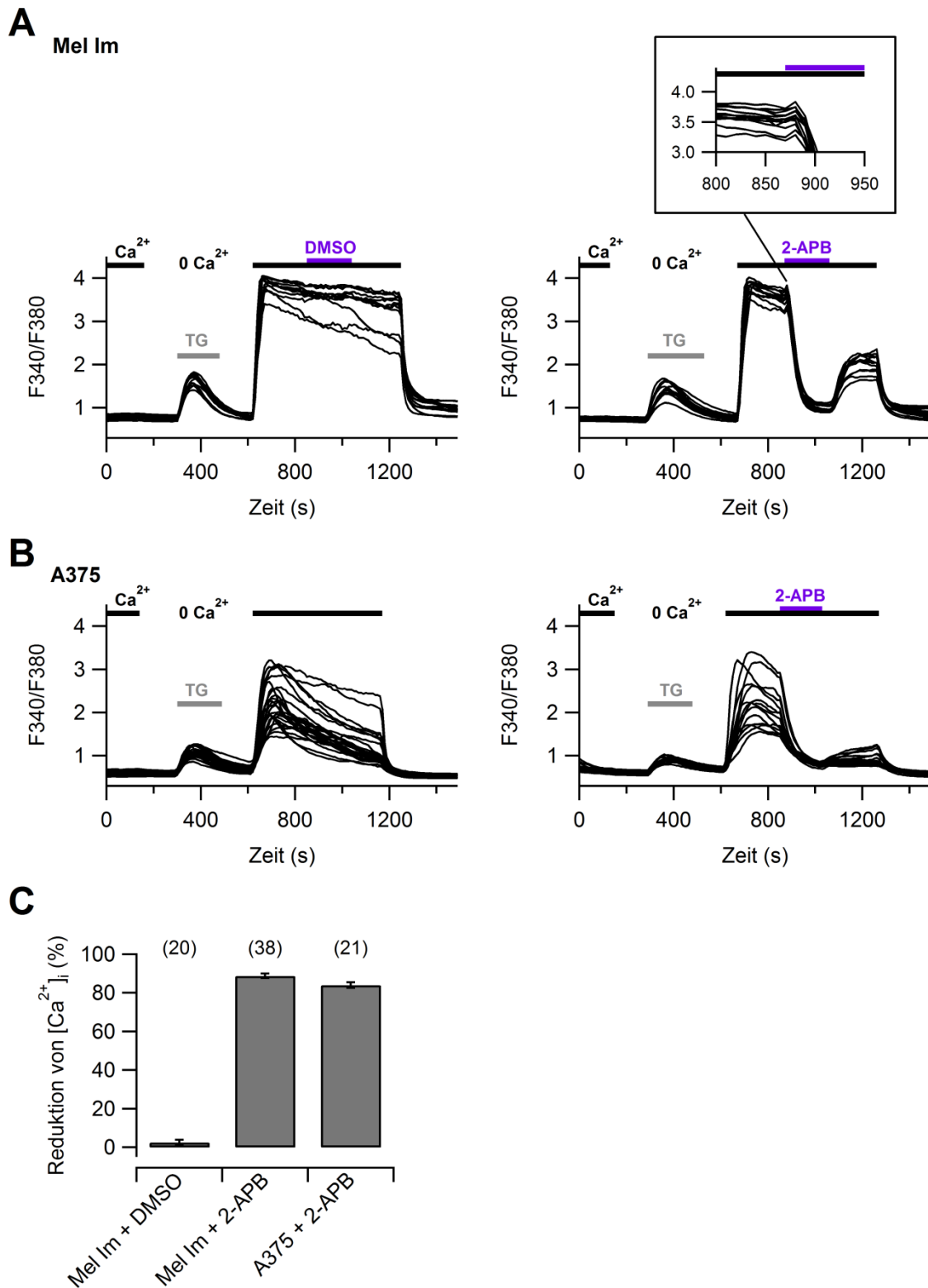


Abbildung 3-12: Nachweis von CRAC-Kanälen in zwei Melanomzelllinien. Mit Fura-2 beladene Mel Im- und A375-Zellen wurden mithilfe der Calcium-Imaging-Methode mit Anregung bei 340 nm und 380 nm untersucht. Die Fura-2-Fluoreszenz wurde bei 510 nm gemessen. Der F340/F380-Quotient ist ein relatives Maß für die Änderung von $[Ca^{2+}]_i$. Alle Messungen wurden in Gegenwart von 2 mM Ca^{2+} -HBSS (schwarze Balken) begonnen. Entleerung der

Ca^{2+} -Speicher wurde durch 1 μM Thapsigargin (grauer Balken) in Ca^{2+} -freiem HBSS induziert. Anschließend wurde durch Wiedereinführung von Ca^{2+} über die Badlösung der speicherabhängige Ca^{2+} -Einstrom über CRAC-Kanäle aktiviert. **(A)** Reversible Inhibition des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms in Mel Im-Zellen. Nach Aufbau eines speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstroms wurde der Badlösung für einige Minuten 50 μM des CRAC-Inhibitors 2-APB (rechts) oder DMSO (Kontrolle, links) hinzugefügt. Bei 2-APB-Zugabe kam es zu Beginn zu einem marginalen Anstieg des F340/F380-Quotienten. Der angezeigte Ausschnitt ist vergrößert dargestellt. **(B)** Reversibler Block kapazitiver Ca^{2+} -Ströme in A375-Zellen durch CRAC-Inhibitor 2-APB (50 μM). **(C)** Relative Reduktion von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch 2-APB und DMSO-Kontrolle in den dargestellten Zelllinien. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Nach Aufbau des TG-induzierten SOCE wurden der Badlösung 50 μM 2-APB zugegeben. Dabei kam es in beiden Melanomlinien zu einem anfänglich marginalen Anstieg und schließlich zum Sinken des F340/F380-Quotienten bis fast auf die Ausgangswerte. Die kurzzeitige Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abb. 3-12 A, rechts, Vergrößerungsausschnitt) spiegelt wahrscheinlich eine Aktivierung von CRAC-Kanälen wider, die bei Konzentrationen unter 10 μM 2-APB stärker ausfällt (Prakriya und Lewis, 2001). Der relative Block des Ca^{2+} -Einstroms durch 2-APB betrug $88,9 \pm 1,2\%$ in Mel Im-Zellen und $84,0 \pm 1,5\%$ in A375-Zellen (Abb. 3-12 C). DMSO allein zeigte keinen hemmenden Effekt auf SOCE ($2,6 \pm 1,3\%$; Abb. 3-12 C und Abb. 3-12 A, links). Der Block durch 2-APB war teilweise reversibel. So stieg der F340/F380-Quotient nach Applikationsstopp des CRAC-Kanalblockers in Mel Im wieder auf $36,8 \pm 3,6\%$ und in A375 auf etwa $20,2 \pm 1,6\%$ des maximalen F340/F380-Wertes an. Die Experimente zeigten somit, dass CRAC-Kanäle in den Melanomlinien A375 und Mel Im funktionell exprimiert werden.

3.2.3 Einfluss von KCa3.1 auf SOCE

Nachdem funktionelle CRAC-Kanäle anhand des Thapsigargin-induzierten Ca^{2+} -Einstromes (SOCE) prinzipiell in Melanomzellen nachweisbar waren, sollte die Frage behandelt werden, ob dieser Ca^{2+} -Einstrom durch die Aktivität des Kaliumkanals KCa3.1 beeinflusst wird. Zu diesem Zweck wurden zwei experimentelle Ansätze verfolgt. Zum einen wurde der KCa3.1-Kanal in der Melanomlinie Mel Im pharmakologisch inhibiert und zum anderen wurde KCa3.1 heterolog in HEK 293-Zellen überexprimiert und jeweils Amplitude und Verlauf der Ca^{2+} -Änderungen (SOCE) untersucht.

Zur Inhibition von KCa3.1 in Mel Im-Zellen wurde der potente Blocker TRAM-34 verwendet. Die Durchführung erfolgte wie unter 3.2.2. beschrieben. Thapsigargin (TG) wurde zum Entleeren intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher und damit zum Auslösen des SOCE eingesetzt. In Abbildung 3-13 A sind repräsentativ die Zeitverläufe des F340/F380-Quotienten von einzelnen Zellen mit (rechts) und ohne Blocker (links) dargestellt. Der Blocker wurde sofort nach dem Äquilibrieren der Zellen mit 2 mM Ca^{2+} -HBSS zugegeben und war während des gesamten Experiments präsent. Die TG-induzierte Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, die in Abwesenheit von

extrazellulärem Ca^{2+} zu beobachten war, zeigte in Gegenwart von TRAM-34 (10 μM) keine signifikante Änderung. Dagegen war der nachfolgende Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) in Gegenwart von TRAM-34 leicht verringert.

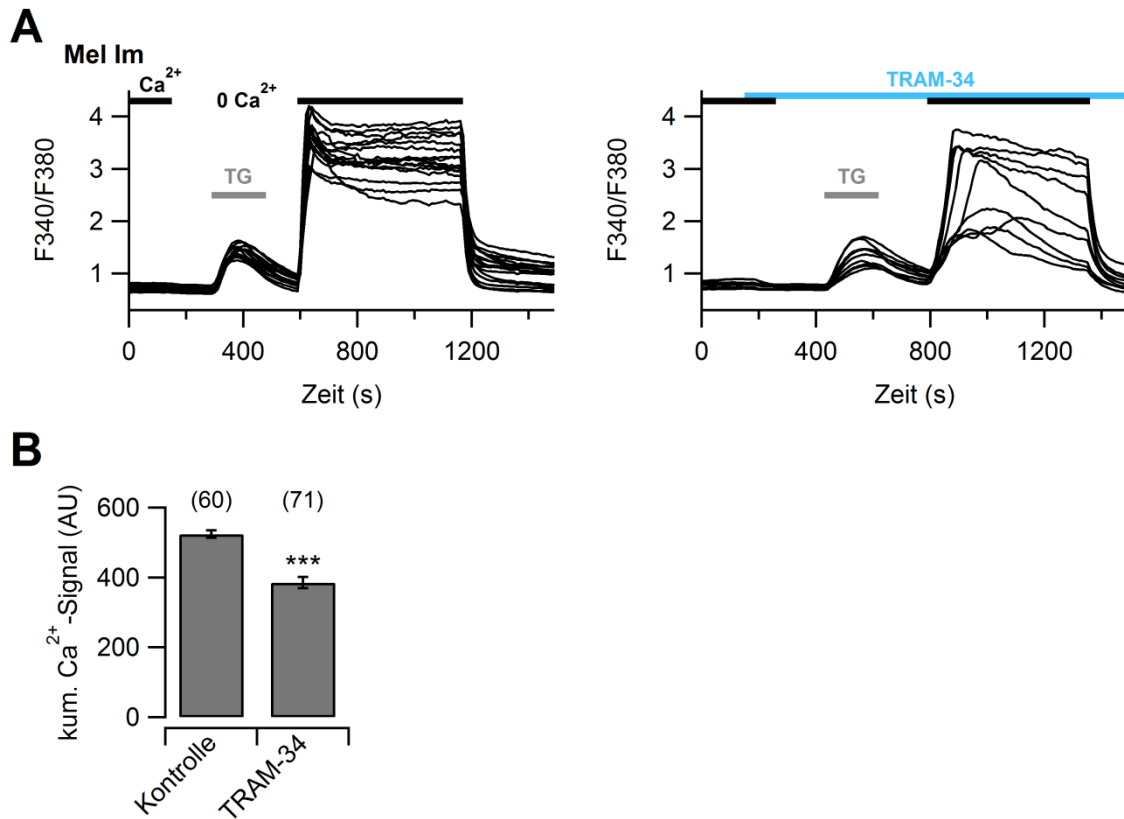


Abbildung 3-13: Einfluss des KCa3.1-Inhibitors TRAM-34 auf den speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom in Mel Im-Zellen. Mit Fura-2 beladene Mel Im-Zellen wurden mithilfe der Calcium-Imaging-Methode untersucht. Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sind als F340/F380-Quotient dargestellt. Untersucht wurde der Einfluss von TRAM-34 auf den speicherabhängigen Ca^{2+} -Einstrom (SOCE, *store-operated Ca^{2+} entry*) in Mel Im-Zellen. Die Zellen wurden mit 2 mM Ca^{2+} -HBSS-Puffer (schwarze Balken) gespült. Die Entleerung der Ca^{2+} -Speicher wurde durch 1 μM Thapsigargin (TG, grauer Balken) in Ca^{2+} -freiem Medium induziert und anschließend mittels Ca^{2+} -haltiger Badlösung der SOCE Ca^{2+} -Einstrom über CRAC-Kanäle ausgelöst. **(A)** Reduktion kapazitiver Ca^{2+} -Einstrome nach Applikation des KCa3.1-spezifischen Inhibitors TRAM-34. Repräsentative speicherabhängige Ca^{2+} -Einstrome (SOCE) in Mel Im-Zellen ohne (links) und mit (rechts) 10 μM TRAM-34. **(B)** Zusammenfassung der Daten für TRAM-34 aus jeweils vier bis fünf unabhängigen Experimenten. Vergleich des kumulierten Ca^{2+} -Signals mit und ohne TRAM-34, berechnet aus dem Integral des F340/F380-Quotienten für 200 s während SOCE (200 s nach erneuter Ca^{2+} -Zugabe) abzüglich der basalen F340/F380-Quotienten vor TG-Applikation. Die Angabe des kumulierten Ca^{2+} -Signals erfolgte in *arbitrary units* (AU). Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist jeweils in Klammern angegeben. Unabhängiger Zweistichproben-t-Test, *** $P < 0,001$.

Zur Gegenüberstellung des Ca^{2+} -Einstroms mit und ohne TRAM-34 wurde als Vergleichsgröße das kumulierte Ca^{2+} -Signal über einen Zeitraum von 200 s bestimmt, berechnet aus dem Integral des F340/F380-Quotienten abzüglich des Grundlevels vor TG-Zugabe. Da nach erneuter Zugabe von 2 mM Ca^{2+} bei einigen Zellen gleich zu Anfang Fura-2 in Sättigung ging, das F340/F380-Signal anschließend aber wieder absank, wurde zur zuverlässigen Berechnung des kumulierten

Ca^{2+} -Signals ein späterer Zeitpunkt (200 s nach erneuter Ca^{2+} -Zugabe) gewählt. Die Angabe des kumulierten Ca^{2+} -Signals erfolgte in AU (*arbitrary units*). Das kumulierte Ca^{2+} -Signal lag in Kontrollzellen bei 523 ± 11 AU im Vergleich zu 385 ± 17 AU mit TRAM-34 (Abb. 3-13 B). Dieser Unterschied war statistisch signifikant (Unabhängiger Zweistichproben-t-Test, $P < 0,001$) und legt einen Einfluss von TRAM-34 auf den Ca^{2+} -Anstieg durch SOCE, also einen indirekten Effekt von KCa3.1 auf die Modulation der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, nahe.

Um eine mögliche Wechselwirkung zwischen CRAC-Kanälen (SOCE) und KCa3.1 unabhängig von pharmakologischen Wirkstoffen zu überprüfen, wurde der Thapsigargin-induzierte SOCE in HEK 293-Zellen untersucht und mit KCa3.1-transfizierten HEK 293-Zellen verglichen. Nach Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher mit TG zeigte sich in den Kontrollzellen ein ähnlicher Verlauf des F340/F380-Quotienten (Abb. 3-14 A) wie zuvor in Melanomlinien beobachtet (vgl. Abb. 3-13). Dabei war jedoch der Ca^{2+} -Einstrom in HEK 293 deutlich geringer. Zum einen war die Amplitude des Ca^{2+} -Signals kleiner und zum anderen war der Abfall von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Erreichen des F340/F380-Maximums stärker und somit die Plateauphase, wie sie bei Mel Im und A375 zu beobachten war, nicht so stark ausgeprägt. Grundsätzlich stehen die Messungen im Einklang mit dem Befund, dass in HEK 293-Zellen die CRAC-Proteine ORAI und STIM vergleichbar stark exprimiert sind wie in Melanomzellen.

In Abbildung 3-14 sind repräsentativ die Zeitverläufe für eine TG-induzierte SOCE-Antwort in HEK 293-Zellen mit (Abb. 3-14 A, rechts) und ohne KCa3.1 (Abb. 3-14 A, links) dargestellt. Die Auswertung erfolgte wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben und unter Angabe des kumulierten Ca^{2+} -Signals als Maß für den Ca^{2+} -Einstrom während SOCE sowie bei Zugabe von TG. Zunächst ist zu beobachten, dass der erste transiente Ca^{2+} -Anstieg während der TG-Applikation unverändert blieb (kumuliertes Ca^{2+} -Signal: $32,0 \pm 1,3$ AU $n=86$, mit KCa3.1: $31,0 \pm 1,6$ AU $n=115$). Da dieser Anstieg in Ca^{2+} -freier Badlösung allein auf Freisetzung aus intrazellulären Speichern erfolgen muss, war hier auch kein Einfluss von KCa3.1 zu erwarten. Im Gegensatz dazu war die eigentliche SOCE-Antwort, also der Anstieg in Ca^{2+} -haltiger Badlösung, in den transfizierten HEK 293-Zellen signifikant höher als in den Kontrollzellen (kumuliertes Ca^{2+} -Signal: 134 ± 6 AU, mit KCa3.1: 228 ± 12 AU; Abb. 3-14 B; unabhängiger Zweistichproben-t-Test, $P < 0,001$). Der beobachtete stärkere Ca^{2+} -Einstrom in KCa3.1-transfizierten Zellen bestätigte prinzipiell die Ausgangshypothese, dass der K^+ -Kanal den Einstrom von Ca^{2+} durch Calciumkanäle der Plasmamembran verstärken kann. CRAC-Kanäle kommen nahezu ubiquitär in menschlichen Zellen vor und waren dementsprechend auch in HEK 293-Zellen nachweisbar. Für eine mögliche therapeutische Anwendung wäre es interessant zu prüfen, ob auch andere Calciumkanäle mit engerem Expressionsprofil in Melanomzellen vorkommen.

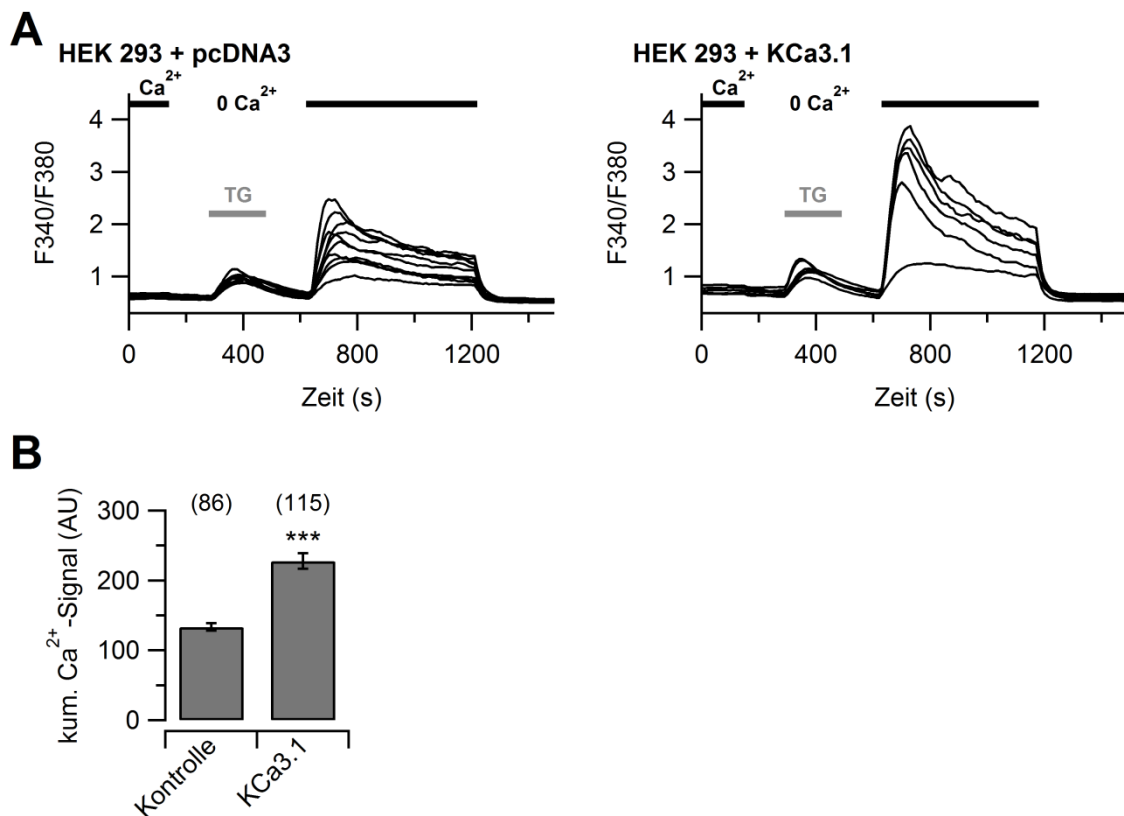


Abbildung 3-14: Einfluss von KCa3.1 auf den speicherabhängigen Ca²⁺-Einstrom. Mit Fura-2 beladene HEK 293-Zellen wurden mithilfe der Calcium-Imaging-Methode untersucht. Änderungen der [Ca²⁺]_i sind als F340/F380-Quotient dargestellt. **(A)** Steigerung der kapazitiven Ca²⁺-Einstrome in Anwesenheit von KCa3.1. Repräsentative speicherabhängige Ca²⁺-Einstrome (SOCE, *store-operated Ca²⁺ entry*) in HEK 293-Zellen, die mit hIK-pcDNA3 (KCa3.1) transfiziert wurden, im Vergleich zu Kontrolltransfektionen (pcDNA3). Die Zellen wurden mit 2 mM Ca²⁺-HBSS-Puffer (schwarze Balken) gespült. Die Entleerung der Ca²⁺-Speicher wurde durch 1 μ M Thapsigargin (grauer Balken) in Ca²⁺-freiem Medium induziert. Anschließend wurde durch Wiedereinführung von Ca²⁺ über die Badlösung der speicherabhängige Ca²⁺-Einstrom über CRAC-Kanäle ausgelöst. Das Beenden kapazitiver Ca²⁺-Ströme erfolgte durch Perfusion mit Ca²⁺-freiem Medium. **(B)** Zusammenfassung der Daten aus A sowie acht bis elf weiteren unabhängigen Experimenten. Vergleich der kumulierten Ca²⁺-Signale der KCa3.1-transfizierten Zellen mit Kontrolltransfektionen, berechnet aus dem Integral des F340/F380-Quotienten für 200 s während SOCE (200 s nach erneuter Ca²⁺-Zugabe) abzüglich der basalen F340/F380-Quotienten vor TG-Applikation. Die Angabe des kumulierten Ca²⁺-Signals erfolgte in *arbitrary units* (AU). Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in Klammern angegeben. Unabhängiger Zweistichproben-t-Test, *** P < 0,001.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Expression von CRAC-Kanälen sowohl auf mRNA-Ebene als auch funktionell in mehreren Melanomlinien nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren konnte der speicherabhängige Ca²⁺-Einstrom über CRAC-Kanäle durch die heterologe Expression von KCa3.1 in HEK 293-Zellen moduliert werden, indem SOCE gesteigert wurde. In Mel Im-Zellen verringerte der KCa3.1-Blocker TRAM-34 den speicherabhängigen Ca²⁺-Einstrom deutlich.

3.2.4 TRP-Kanäle in Melanomzellen

Neben den ubiquitären CRAC-Kanälen kommt noch eine große Zahl weiterer Kanäle in Frage, über die Ca^{2+} in Zellen einströmen kann. Sowohl für eine umfassende Untersuchung der Calciumhomöostase in Melanomzellen als auch im Hinblick auf mögliche therapeutische Angriffspunkte war es daher wichtig, weitere Kandidaten zu identifizieren und auf funktionelle Expression zu prüfen. Die größte Gruppe von Kanalproteinen, die nicht spannungsabhängig geöffnet werden, findet sich in der TRP-Genfamilie. Einige Mitglieder dieser Familie leiten Ca^{2+} , so verfügen TRPV5 und TRPV6 der TRPV-Unterfamilie über eine hohe Ca^{2+} -Selektivität, während TRPV1-4 und die Mitglieder der TRPC-Unterfamilie nur eine schwache bis moderate Ca^{2+} -Selektivität besitzen (Owsianik et al., 2006; Venkatachalam und Montell, 2007). Die folgenden Analysen wurden auf diese beiden Unterfamilien beschränkt, da für diese bereits eine Rolle in verschiedenen Krebsarten bekannt ist (Lee et al., 2011; Fiorio Pla und Gkika, 2013). Da TRP-Kanäle zudem eine höhere Gewebsspezifität aufweisen als CRAC-Kanäle, wären Kandidaten aus dieser Familie mit höherer Wahrscheinlichkeit auch für therapeutische Anwendungen geeignet.

Zur Kandidatensuche wurde wiederum die quantitative *real-time* RT-PCR eingesetzt, um zunächst mRNA-Expressionsprofile für alle im Menschen vorkommenden Gene der Familien TRPC und TRPV zu erstellen. Das Gen *TRPC2* wurde nicht einbezogen, da es im Menschen nur als Pseudogen vorliegt (Wes et al., 1995). Neben den Melanomlinien A375, Mel Im und IGR1 wurden wiederum auch HEK 293-Zellen untersucht. Abbildung 3-15 zeigt die Expressionsmuster für die TRPC- und TRPV-Unterfamilien. Die jeweilig bestimmten Ct-Werte wurden auf das Haushaltsgen β -Aktin normiert. Bei den Genen *TRPC1* und *TRPC3-6* war die Expression in den Melanomlinien niedriger als in HEK 293. Die Expression von *TRPC7* war in HEK 293 und den Melanomlinien etwa gleich stark. In der TRPV-Genfamilie konnte für *TRPV5* eine geringe Expression in HEK 293, in den Melanomlinien dagegen konnten keine Transkripte für *TRPV5* nachgewiesen werden.

Um falsch negative Ergebnisse sicher auszuschließen, wurden jeweils mindestens zwei unabhängige, kommerzielle Primerpaare verwendet, die speziell für die Anwendung in quantitativen *real-time* RT-PCR-Analysen entwickelt waren. Im Falle von *TRPV6* wurden drei verschiedene Primerpaare eingesetzt. Die gezeigten Ergebnisse wurden jeweils mit dem Primerpaar erstellt, das die stärkste Amplifikation erreichte und dabei ein spezifisches Produkt der erwarteten Länge ergab.

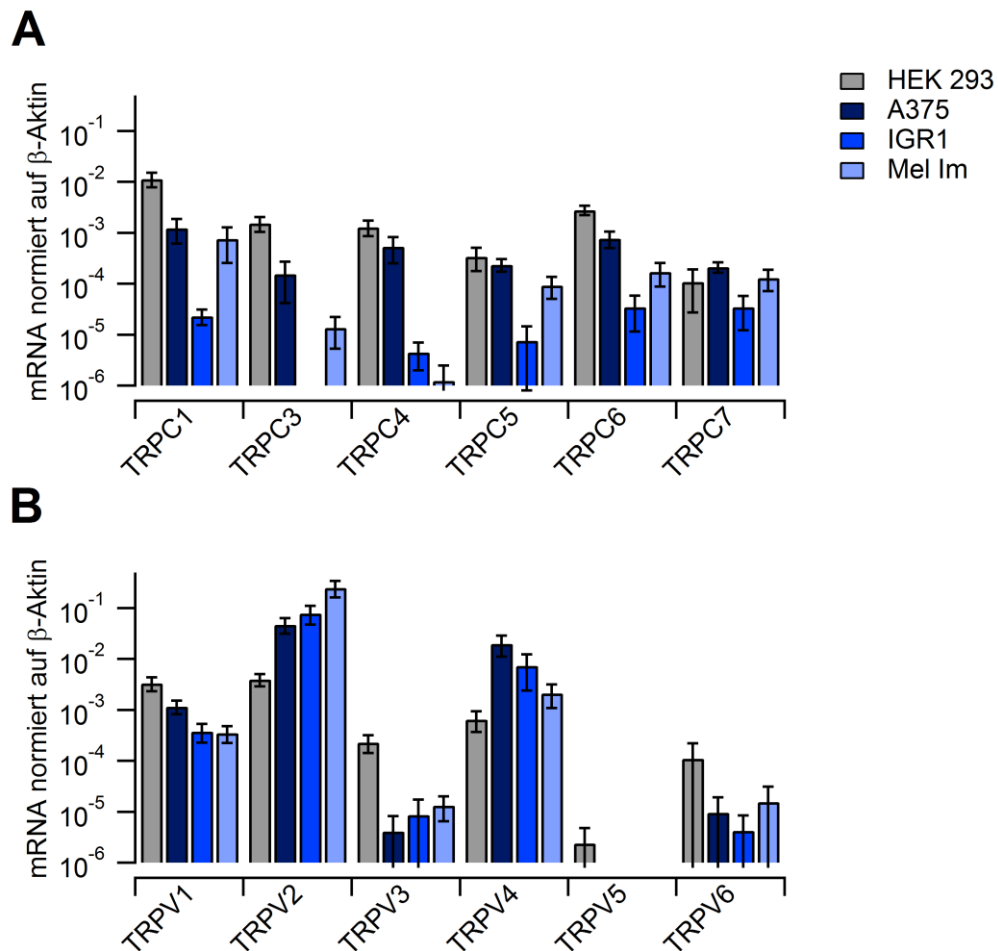


Abbildung 3-15: mRNA-Level für Ionenkanäle der TRPC- und TRPV-Familien in Melanomzelllinien und in HEK 293-Zellen. mRNA wurde aus HEK 293-Zellen und aus den Melanomlinien A375, IGR1 sowie Mel Im isoliert. Die Analyse erfolgte mittels quantitativer *real-time* RT-PCR. Es sind die Mittelwerte \pm SEM für die Familien TRPC (**A**) und TRPV (**B**) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten je Zelllinie gezeigt. Die Daten wurden auf β -Aktin normiert.

TRPV3 und *TRPV6* waren in allen Linien als mRNA-Transkripte nachweisbar, dabei lag die Expression in HEK 293 aber deutlich höher als in den Melanomlinien. Besonders auffallend war in Melanomzellen die Expression der drei Gene *TRPV1*, *TRPV2* und *TRPV4*. Für alle drei konnte mRNA sowohl in HEK293 als auch in den untersuchten Melanomlinien nachgewiesen werden. Im Falle von *TRPV2* und *TRPV4* war die Expression in allen drei Melanomlinien deutlich höher als in HEK 293-Zellen. Für *TRPV1* zeigten sich hinsichtlich des Expressionsniveaus keine auffälligen Unterschiede zwischen HEK 293 und den Melanomlinien. Die beiden Vertreter der TRPV-Familie, *TRPV2* und *TRPV4*, erfüllten zwei wichtige Kriterien für eine mögliche funktionelle Aktivität in Melanomzellen. Sie konnten auf mRNA-Ebene in allen drei Melanomlinien nachgewiesen werden und zeigten eine höhere Expression als in HEK 293. Für HEK 293 ist bisher in der Literatur keine funktionelle Expression von Genen der TRPC und TRPV-Familien beschrieben. Die Kanäle

TRPV1, *TRPV2* und *TRPV4* wurden nachfolgend gezielt auf eine funktionelle Expression hin getestet.

3.2.5 Untersuchung von Melanomzellen auf endogene Aktivität von TRPV1

Der Nachweis von mRNA durch RT-PCR oder andere Methoden ist sehr gut geeignet, um einen ersten Überblick über die Expression von Genen zu erhalten. Diese Methode kann aber Studien auf Proteinebene nicht ersetzen. Für Kanalproteine ist letztlich immer der funktionelle Nachweis entscheidend, um zu zeigen, dass das Protein die Plasmamembran erreicht hat und dort in aktiver Form vorliegt. Ein solcher funktioneller Nachweis setzt voraus, dass beispielsweise möglichst spezifische Methoden zur Aktivierung oder zur Hemmung verfügbar sind. TRPV1 wird durch Hitze oberhalb von 43 °C aktiviert (Caterina et al., 1997), aber auch andere Kanäle der TRP-Familie sind über Temperatur aktivierbar (Caterina et al., 1999; Montell, 2005). TRPV1-Aktiveringung ist darüber hinaus durch eine Reihe von Substanzen möglich. Hierzu gehören zum Beispiel das Endocannabinoid Anandamid, Piperin aus schwarzem Pfeffer und auch Campher (Zygmunt et al., 1999; McNamara et al., 2005; Xu et al., 2005). Seinen ursprünglichen Namen „Capsaicin-Rezeptor“ erhielt der Kanal, weil er durch das Vanilloid Capsaicin stark aktivierbar ist. Capsaicin wird experimentell sehr häufig verwendet und gilt als potenter und sehr selektiver TRPV1-Agonist (Pingle et al., 2007; Vriens et al., 2009). Um die funktionelle Expression von TRPV1 in Melanomzellen zu überprüfen, wurden daher A375 und Mel Im jeweils mit 10 µM und 100 µM Capsaicin behandelt und die Fura-2-Fluoreszenz gemessen. Diese Messungen erfolgten in 2 mM Ca^{2+} -HBSS. In beiden Zelllinien hatte Capsaicin, auch in der hohen Konzentration, keinen Effekt auf den F340/F380-Quotienten und damit $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Abbildung 3-16 zeigt exemplarisch die Zeitverläufe des F340/F380-Quotienten für 10 µM Capsaicin in A375- und Mel Im-Zellen.

Die Wirksamkeit des verwendeten Capsaicin wurde durch analoge Messungen an Neuronen aus dem Hinterwurzelganglion der Maus (DRG-Neuronen) verifiziert (nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit Literaturbefunden zur Expression von TRPV1 (Caterina et al., 1999) bewirkte 10 µM Capsaicin in DRG-Neuronen einen schnellen Anstieg des F340/F380-Quotienten. Demzufolge ist davon auszugehen, dass die beiden getesteten Melanomlinien trotz der nachweisbaren mRNA nicht über funktionelle TRPV1-Kanäle verfügen.

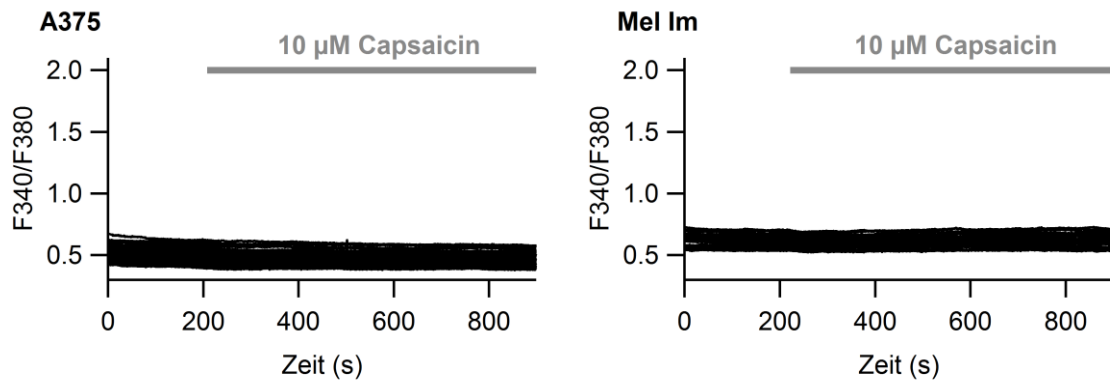


Abbildung 3-16: TRPV1-Agonist Capsaicin zeigt keine TRPV1- Ca^{2+} -Antwort in Melanomzelllinien. Mit Fura-2 beladene A375- und Mel Im-Zellen wurden mithilfe der Calcium-Imaging-Methode auf das Vorhandensein von TRPV1-Kanälen untersucht. Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sind als F340/F380-Quotient dargestellt. Alle Messungen wurden in 2 mM Ca^{2+} -HBSS-Puffer durchgeführt. Weder in A375- (links) noch in Mel Im-Zellen (rechts) kam es nach extrazellulärer Applikation des TRPV1-Agonisten Capsaicin (grau) zu einer Änderung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Der Zeitverlauf von > 20 Zellen ist exemplarisch dargestellt.

3.2.6 Untersuchung von Melanomzellen auf endogene Aktivität von TRPV2

TRPV2 wird durch Temperaturen oberhalb von 52 °C und diverse chemische Liganden aktiviert (Caterina et al., 1999), jedoch fehlt es bisher an selektiven Agonisten für diesen TRP-Kanal. Zur Aktivierung wurde in dieser Arbeit Probenecid verwendet. Bang et al. zeigten, dass in HEK 293T-Zellen heterolog exprimierte rTRPV2 durch Probenecid aktiviert werden, wohingegen andere thermosensitive TRP-Kanäle wie rTRPV1, rTRPV3, rTRPV4, mTRPM8 und mTRPA1 keine signifikante Reaktion auf Probenecid zeigten (Bang et al., 2007). Ebenso belegten Studien an Kardiomyozyten von Mäusen, dass eine Änderung der Ca^{2+} -Konzentration und Kontraktilität dieser Zellen durch Aktivierung von TRPV2-Kanälen mit Probenecid auslösbar ist (Koch et al., 2012). Es wurden wiederum die Melanomlinien A375 und Mel Im für funktionelle Expressionsstudien ausgewählt und mit Probenecid in zwei verschiedenen Konzentrationen (100 µM und 1 mM) behandelt. In keiner der beiden Zelllinien kam es zu einer Änderung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Probenecid. In Abbildung 3-17 sind repräsentativ die F340/F380-Verläufe für je ein Experiment mit 1 mM Probenecid in A375 und Mel Im dargestellt. Angesichts der relativ hohen mRNA-Konzentrationen in diesen Melanomlinien ist dieses Ergebnis überraschend, unterstreicht aber die Wichtigkeit funktioneller Untersuchungen in Ergänzung zu Expressionsanalysen auf RNA-Niveau.

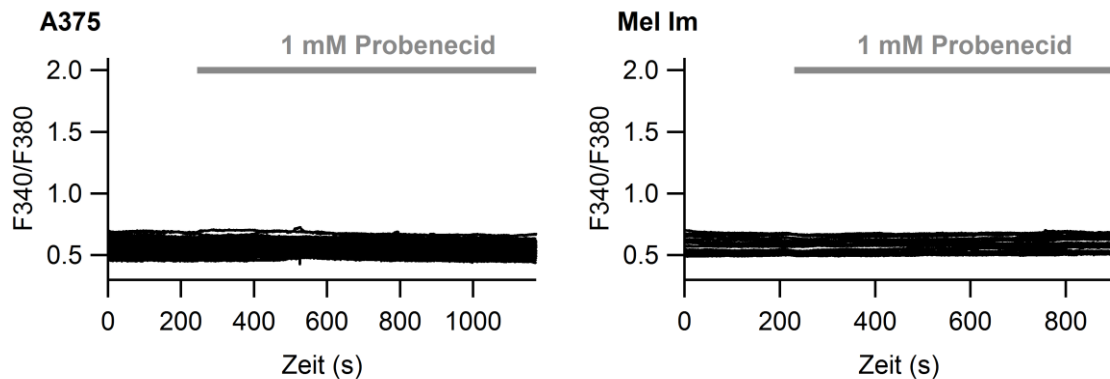


Abbildung 3-17: TRPV2-Agonist Probenecid zeigte keine TRPV2- Ca^{2+} -Antwort in Melanomzelllinien. Mit Fura-2 beladene A375- und Mel Im-Zellen wurden mithilfe der Calcium-Imaging-Methode auf das Vorhandensein von TRPV2-Kanälen untersucht. Änderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sind als F340/F380-Quotient dargestellt. Gezeigt ist jeweils der Zeitverlauf von mindestens 20 Zellen. Alle Messungen wurden in 2 mM Ca^{2+} -HBSS-Puffer durchgeführt. Die Perfusion von A375- (links) und Mel Im-Zellen (rechts) mit 1 mM des TRPV2-Agonisten Probenecid führte zu keiner Änderung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

3.2.7 Untersuchung von Melanomzellen auf endogene Aktivität von TRPV4

Natürliche und synthetische Agonisten des TRPV4-Kanals sind unter anderem der Phorbolster 4α -PDD, Arachidonsäure und GSK1016790A (Watanabe et al., 2002; Watanabe et al., 2003; Thorneloe et al., 2008). Für diesen TRP-Kanal stehen neben selektiven Aktivatoren auch verschiedene Blocker zur Verfügung. Als potenter und selektiver TRPV4-Antagonist wurde HC-067047 beschrieben (Everaerts et al., 2010).

Die ersten Untersuchungen auf eine funktionelle TRPV4-Expression erfolgten mit GSK1016790A. Dieser von Thorneloe et al. entwickelte niedermolekulare Ligand besitzt eine etwa 300-fach höhere Potenz ($\text{EC}_{50} = 2,1 \text{ nM}$) als 4α -PDD (Thorneloe et al., 2008). Dies zeigten elektrophysiologische Messungen und Messungen des Ca^{2+} -Einstroms an HEK 293-Zellen, welche TRPV4 heterolog exprimierten (Thorneloe et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden die Melanomlinien A375 und Mel Im untersucht. HEK 293-Zellen, welche laut Strotmann et al. TRPV4 nicht exprimieren (Strotmann et al., 2000), sollten als Kontrolle dienen. Die Zellen wurden kontinuierlich mit 2 mM Ca^{2+} -HBSS gespült und die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) wie in Abbildung 3-18 als F340/F380-Quotient dargestellt. Zur Aktivierung von TRPV4 wurden 10 nM GSK1016790A der Badlösung hinzugefügt. In A375-Zellen kam es nach Applikation des Aktivators zu einem raschen Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf sehr hohe F340/F380-Quotienten, die während der gesamten Applikationszeit konstant blieben. Alle Zellen reagierten etwa im gleichen Maße (Abb. 3-18 A). Auch in Mel Im kam es nach Applikation von GSK1016790A zu einer starken Erhöhung des F340/F380-Quotienten mit anschließender Plateauphase (Abb. 3-18 B). Die Menge an einströmenden Ca^{2+} (kumuliertes Ca^{2+} -Signal) für die einzelnen Zelllinien nach GSK1016790A-Behandlung ist in Abbildung 3-18 D zusammengefasst.

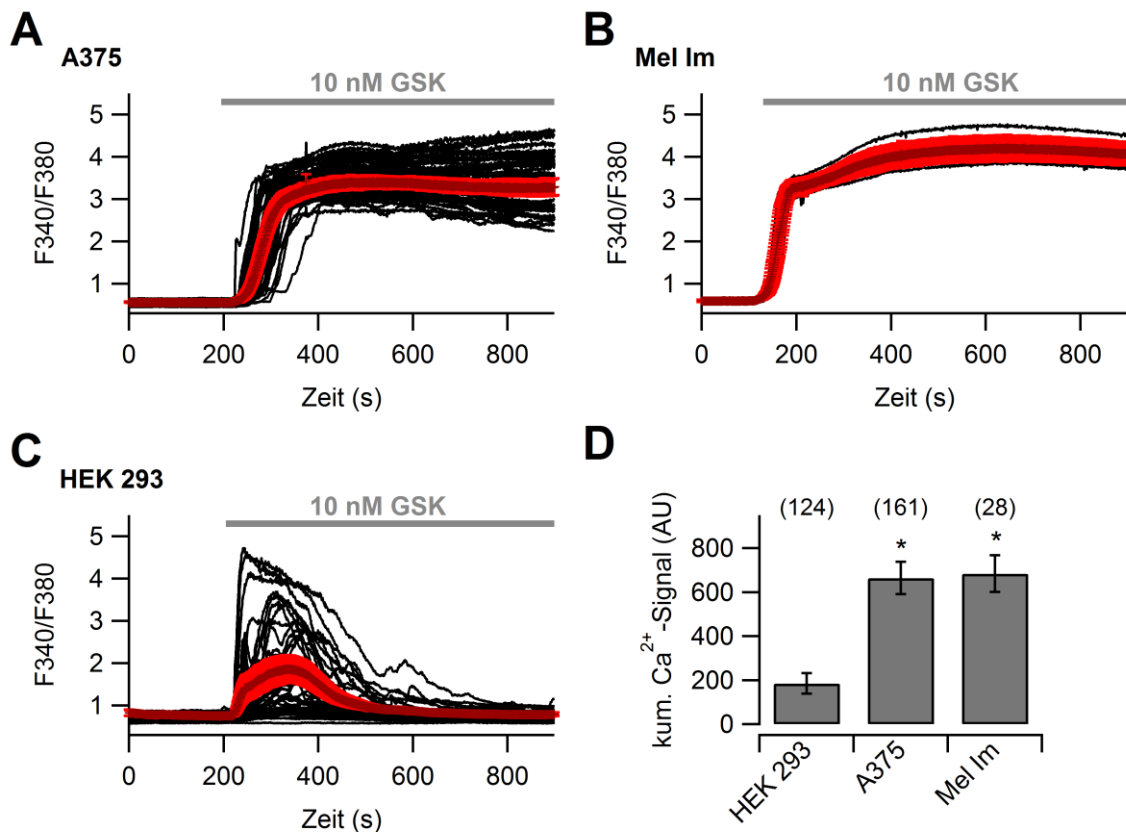


Abbildung 3-18: Funktionelle Expression von TRPV4 in Melanomzelllinien. HEK 293-Zellen sowie die Melanomlinien A375 und Mel Im wurden mit Fura-2 beladen und mithilfe der Calcium-Imaging-Methode auf das Vorhandensein von TRPV4-Kanälen untersucht. Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ sind als F340/F380-Quotient dargestellt. Alle Messungen wurden in 2 mM Ca^{2+} -HBSS-Puffer durchgeführt. Zur selektiven Aktivierung von TRPV4 wurde der Agonist GSK1016790A verwendet. (A-C) Gezeigt sind exemplarisch die Zeitverläufe der jeweiligen Ca^{2+} -Antwort (F340/F380) von 10 bis 60 Zellen. Zur anschaulicheren Darstellung wurden zusätzlich zu den Ca^{2+} -Antworten individueller Zellen (schwarz) die Mittelwertskurven (dunkelrot) mit einem Konfidenzintervall von 95% (hellrot) für das jeweilige Experiment gezeigt. Repräsentativer Ca^{2+} -Einstrom in A375-Zellen (A) und Mel Im-Zellen (B) nach externer Applikation von 10 nM GSK1016790A. Je nach Charge konnte auch in HEK 293-Zellen (C) nach Zugabe von 10 nM GSK1016790A eine Erhöhung des F340/F380-Quotienten beobachtet werden. (D) Vergleich der kumulierten Ca^{2+} -Signale (AU) nach Zugabe von 10 nM GSK1016790A in Melanomlinien und HEK 293-Zellen. Das kumulierte Ca^{2+} -Signal bezieht sich jeweils auf das Integral des F340/F380-Quotienten über 200 s mit einer Verzögerung von 100 s nach Applikationsstart und abzüglich der Grundlinie vor Applikation von GSK1016790A. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM. Die Anzahl der Zellen ist in Klammern angegeben und stammt aus je drei unabhängigen Experimenten. Unabhängiger Zweistichproben-t-Test, * $P < 0,05$.

Wie die Ergebnisse der quantitativen *real-time* PCR bereits vermuten ließen (Abb. 3-15), reagierten auch HEK 293-Zellen auf GSK1016790A mit einer Ca^{2+} -Zunahme, allerdings mit deutlich geringerer Amplitude und Dauer des Ca^{2+} -Signals (Abb. 3-18 C). Die Menge an einströmenden Ca^{2+} war in HEK 293 weniger einheitlich; manche Zellen reagierten stärker, andere schwächer. Insgesamt war das kumulierte Ca^{2+} -Signal jedoch in HEK 293 signifikant geringer als in den beiden Melanomlinien (HEK 293: 185 ± 47 AU; A375: 665 ± 74 AU; Mel Im: 684 ± 85 AU; unabhängiger Zweistichproben-t-Test; $P < 0,05$; Abb. 3-18 D).

Es ist zu beachten, dass Fura-2 in den Melanomlinien schon bei sehr geringen Konzentrationen an GSK1016790A in Sättigung ging, so dass die hier berechneten AU für das kumulierte Ca^{2+} -Signal nur ungefähre Werte darstellen und sehr wahrscheinlich noch höher liegen dürften. Im Weiteren wurde bei der Untersuchung von TRPV4 mit 4α -PDD gearbeitet anstelle von GSK1016790A. GSK1016790A ließ sich nur schwer wieder aus den eingesetzten Applikationsschläuchen entfernen, so dass Verfälschungen der nachfolgenden Experimente nur sehr schwer vermeidbar waren. Zudem war in Arbeiten von Jin et al. gezeigt worden, dass dieser Agonist die behandelten Zellen in einen dauerhaften Zustand erhöhter Ca^{2+} -Konzentration treibt (Jin et al., 2011).

Für 4α -PDD werden EC_{50} -Werte von 0,37 bis 6,7 μM in der Literatur angegeben (Watanabe et al., 2002; Thorneloe et al., 2008; Klausen et al., 2009). Diese bis zu 20-fache Abweichung in der Potenz ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Expressionssysteme und Messmethoden zurückzuführen. Aus diesem Grund wurden verschiedene Konzentrationen an 4α -PDD getestet, um eine homogene und reproduzierbare Ca^{2+} -Antwort zu erhalten. Dazu wurde die Melanomlinie A375 verwendet und 4α -PDD in drei verschiedenen Konzentrationen (0,01; 0,1 und 1 μM) eingesetzt. Die Zellen wurden permanent mit 2 mM Ca^{2+} -HBSS gespült und 4α -PDD nach Äquilibration der Zellen zur Badlösung zugegeben. Es wurde für jede Zelle das kumulierte Ca^{2+} -Signal bestimmt, indem die gemessenen F340/F380-Quotienten über 200 s abzüglich der Grundlinie vor Applikation von 4α -PDD integriert wurden. Da die einzelnen Zellen unterschiedlich schnell auf 4α -PDD reagierten, wurde die durchschnittliche lineare Anstiegszeit vom Zeitpunkt der Zugabe bis 70% des F340/F380-Maximums bestimmt, welche $351,4 \pm 8,4$ s betrug. 350 s nach Applikationsbeginn von 4α -PDD wurde daher als allgemeiner Startpunkt für die Integration des F340/F380-Quotienten gewählt. Diese Auswertungsmethode wurde auch in den folgenden Experimenten angewandt. Die Darstellung der Daten erfolgte hier als Box-Whisker-Plot, um die Streuung der berechneten kumulierten Ca^{2+} -Signale bei der jeweiligen Aktivator-Konzentration zuverlässig wiederzugeben. Negative Werte stehen für eine Abnahme des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts während der Zugabe von 4α -PDD. Wie in Abbildung 3-19 B zu sehen ist, führte die Applikation von 10 nM 4α -PDD noch zu keiner Änderung des relativen Ca^{2+} -Einstroms (Median \pm MAD = $-0,6 \pm 1,8$ AU). Erst bei 100 nM 4α -PDD kam es zu einem Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den Zellen. Bei diesen Konzentrationen schwankten die Amplituden der Ca^{2+} -Signale und damit die Menge an einströmenden Ca^{2+} erheblich (Median \pm MAD = 153 ± 150 AU; Abb. 3-19 B). Die Ca^{2+} -Signale bei 1 μM 4α -PDD blieben dagegen stabiler (Median \pm MAD = 407 ± 33 AU; Abb. 3-19 B). Daher wurde in den folgenden Experimenten mit 1 μM 4α -PDD gearbeitet und da die berechneten Ca^{2+} -Einstrome bei dieser Konzentration eine Normalverteilung aufwiesen, wurden Mittelwerte \pm SEM bestimmt. Abbildung 3-19 A zeigt exemplarisch die Verläufe des F340/F380-Quotienten für einzelne Zellen der Linie A375 nach Applikation von 1 μM 4α -PDD.

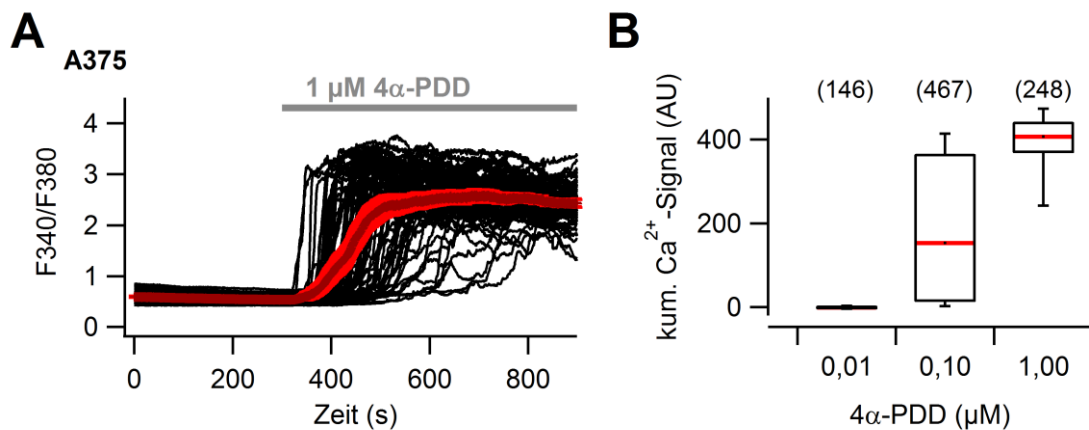


Abbildung 3-19: Funktionelle Expression von TRPV4 in A375. A375-Zellen wurden mit Fura-2 beladen und mithilfe der Calcium-Imaging-Methode auf das Vorhandensein von TRPV4-Kanälen untersucht. Änderungen von $[Ca^{2+}]_i$ sind als F340/F380-Quotient dargestellt. Alle Messungen wurden in 2 mM Ca^{2+} -HBSS-Puffer durchgeführt. Zur selektiven Aktivierung von TRPV4 wurde der Agonist 4 α -PDD eingesetzt. **(A)** Ca^{2+} -Einstrom in A375-Zellen nach externer Applikation von 1 μ M 4 α -PDD. Gezeigt sind exemplarisch die Zeitverläufe der Ca^{2+} -Antworten (F340/F380, schwarz) von > 80 Zellen sowie der aus den einzelnen Kurven berechnete Mittelwert (dunkelrot) mit einem Konfidenzintervall von 95% (hellrot). **(B)** Konzentrationsabhängige Wirkung von 4 α -PDD in A375-Zellen. Dargestellt ist der kumulierte Ca^{2+} -Einstrom (AU) über 200 s und 350 s nach Applikationsbeginn. Medianwerte sind rot hervorgehoben, ermittelt aus drei bis neun unabhängigen Experimenten. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in Klammern angegeben.

Die starke Reaktion der Melanomlinie A375 auf zwei bekannte Agonisten von TRPV4 spricht dafür, dass der Kanal in diesen Zellen funktionell exprimiert ist. Um zu bestätigen, dass es sich hierbei tatsächlich um einen TRPV4-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom handelte, wurden zwei weitere Experimente durchgeführt. Zum einen wurde das extrazelluläre Ca^{2+} der Badlösung entfernt, um zu prüfen, ob der messbare Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ nach 4 α -PDD-Zugabe auf einen Ca^{2+} -Einstrom von außen in die Zellen zurückzuführen ist und nicht von der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern stammt. Zum anderen wurde der als sehr selektiv beschriebene TRPV4-Blocker HC-067047 (Everaerts et al., 2010) eingesetzt.

Zur Arbeit unter Ca^{2+} -freien Bedingungen wurde der HBSS-Badlösung statt 2 mM Ca^{2+} 2 mM EGTA zugesetzt. Die Zellen wurden zunächst jeweils mit normalem HBSS (2 mM Ca^{2+}) äquilibriert, dann folgte Ca^{2+} -freies HBSS und schließlich die Zugabe von 1 μ M 4 α -PDD. Ohne Ca^{2+} im extrazellulären Medium kam es mit 4 α -PDD auch zu keinem Anstieg des F340/F380-Quotienten beziehungsweise $[Ca^{2+}]_i$ in A375-Zellen. Das kumulierte Ca^{2+} -Signal war sogar leicht negativ ($-5,5 \pm 1,5$ AU; Abb. 3-20 D), das heißt es stellte sich ein neues Gleichgewicht der Ca^{2+} -Konzentration ein. Ein repräsentativer Verlauf des F340/F380-Quotienten in A375 ist in Abb. 3-20 A zu sehen.

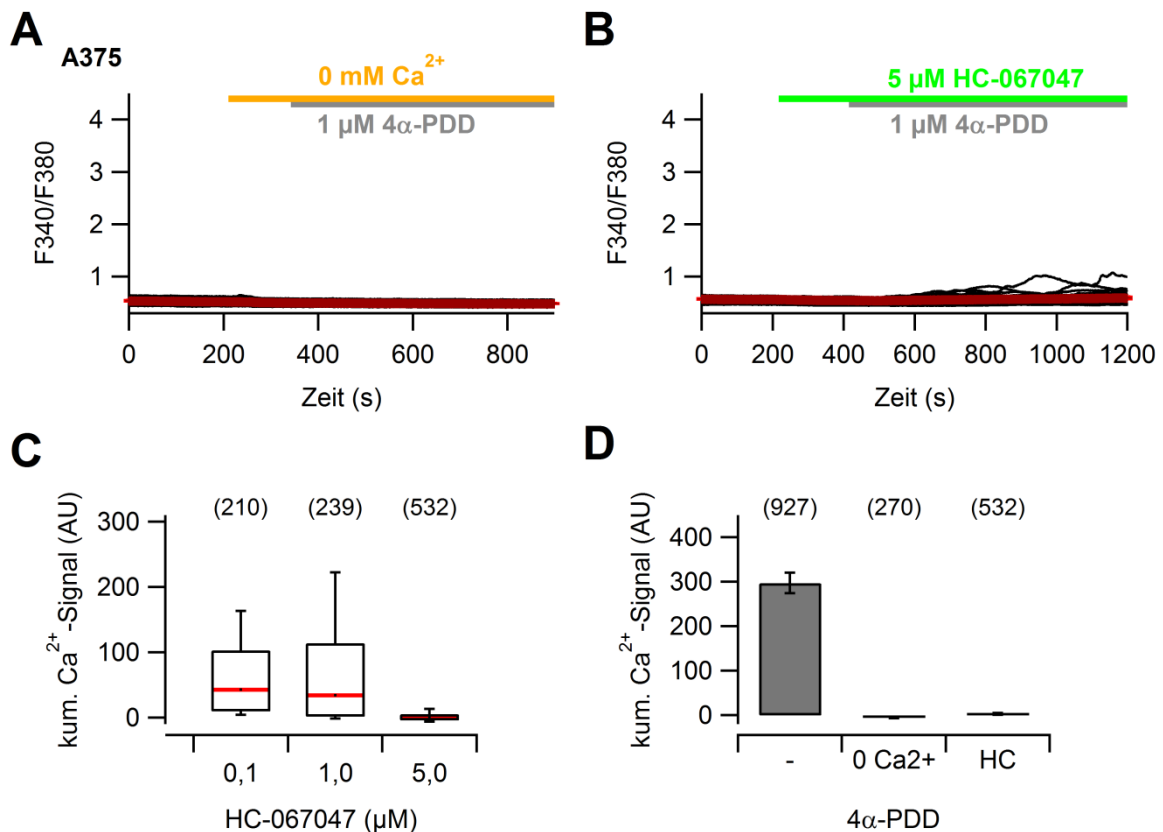


Abbildung 3-20: 4 α -PDD-induzierte Ca^{2+} -Antworten in A375-Zellen sind TRPV4-abhängig. Mit Fura-2 beladene A375-Zellen wurden mithilfe der Calcium-Imaging-Methode untersucht. Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sind als F340/F380-Quotient dargestellt. Alle Messungen wurden in 2 mM Ca^{2+} -HBSS-Puffer durchgeführt. **(A)** Der Ca^{2+} -Einstrom über TRPV4 benötigt extrazelluläres Ca^{2+} . Gezeigt sind repräsentative Ca^{2+} -Antworten in A375-Zellen nach externer Applikation von 1 μM 4 α -PDD in Ca^{2+} -freiem HBSS sowie deren Mittelwertskurve (dunkelrot) mit einem Konfidenzintervall von 95% (hellrot). In Abwesenheit von externem Ca^{2+} bleibt der durch 4 α -PDD induzierte Ca^{2+} -Einstrom und damit eine Erhöhung des F340/F380-Quotienten aus. **(B)** Block 4 α -PDD-induzierter Ca^{2+} -Ströme durch den TRPV4-spezifischen Inhibitor HC-067047 (5 μM). Gezeigt sind repräsentative Zeitverläufe der Ca^{2+} -Antworten (F340/F380, schwarz) von etwa 60 Zellen und deren Mittelwert (dunkelrot) mit einem Konfidenzintervall von 95% (hellrot). **(C)** Dargestellt ist der relative Ca^{2+} -Einstrom über 200 s und 350 s nach Applikationsbeginn mit 4 α -PDD und verschiedenen Konzentrationen an HC-067047 (Integration der Fläche unterhalb F340/F380 abzüglich des Ca^{2+} -Gehalts vor Zugabe des Agonisten). Medianwerte sind rot hervorgehoben, ermittelt aus vier bis acht unabhängigen Experimenten. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in Klammern angegeben. **(D)** Zusammenfassung der Experimente mit 4 α -PDD allein (-), in Ca^{2+} -freiem HBSS (0 Ca^{2+}) sowie in Gegenwart von 5 μM HC-067047 (HC). Berechnet wurden die kumulierten Ca^{2+} -Signale (AU) über einen Zeitraum von 200 s. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in Klammern angegeben.

Dies bestätigt, dass es sich bei dem durch 4 α -PDD ausgelösten Ca^{2+} -Anstieg um einen Einstrom von Ca^{2+} aus der extrazellulären Lösung handelte. In einem Hochdurchsatz-Screening von niedermolekularen TRPV4-Antagonisten wurde HC-067047 als selektiver Blocker von Everaerts et al. identifiziert (Everaerts et al., 2010). Im Vergleich mit TRPC, TRPA und weiteren TRPV-Kanälen sowie spannungsabhängigen Na^+ - und K^+ -Kanälen zeigten nur TRPM8 und hERG eine signifikante Beeinträchtigung durch HC-067047 im submikromolaren Bereich. Patch-Clamp-Untersuchungen an HEK-Zellen, die mit TRPV4-Orthologen transfiziert worden waren, lieferten

IC₅₀-Werte im nanomolaren Bereich. In Calcium-Imaging-Experimenten führten 1 μ M HC-067047 zu einem vollständigen Block von TRPV4-induzierten Ca²⁺-Signalen (Everaerts et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Inhibition des durch 4 α -PDD hervorgerufenen Ca²⁺-Einstroms verschiedene Konzentrationen an HC-067047 getestet. Die Konzentrationen 0,1 μ M und 1 μ M führten bereits zu einer Reduktion des kumulierten Ca²⁺-Signals. Die Darstellung der Daten erfolgte als Box-Whisker-Plot und die Angabe des kumulierten Ca²⁺-Signals für die verschiedenen Blocker-Konzentrationen in Median \pm MAD (0,1 μ M HC-067047: 42,9 \pm 36,2 AU; 1 μ M HC-067047: 34,6 \pm 34,9 AU; Abb. 3-20 C). 5 μ M HC-067047 waren schließlich ausreichend, um einen vollständigen Block des Ca²⁺-Einstroms nach Stimulation mit 4 α -PDD zu erreichen (5 μ M HC-067047: 0,1 \pm 2,9 AU; Abb. 3-20 C). In Abb. 3-20 B sind exemplarisch die Ca²⁺-Antworten einzelner A375-Zellen auf 1 μ M 4 α -PDD und 5 μ M HC-067047 abgebildet. In Abbildung 3-20 D sind die Mittelwerte \pm SEM für die kumulierten Ca²⁺-Signale mit 1 μ M 4 α -PDD in 2 mM Ca²⁺-HBSS, in Ca²⁺-freiem HBSS sowie in Kombination mit dem TRPV4-Blocker HC-067047 für die Melanomlinie A375 zusammengefasst (4 α -PDD in 2 mM Ca²⁺-HBSS: 297,7 \pm 23,1 AU; 4 α -PDD in Ca²⁺-freiem HBSS: -5,5 \pm 1,5 AU; 4 α -PDD mit HC-067047: 3,1 \pm 2,2 AU).

Auch in Mel Im- und IGR1-Zellen wurde auf eine funktionelle Expression von TRPV4 getestet. Hier zeigte sich nach Applikation von 1 μ M 4 α -PDD ein ähnlicher Verlauf des Ca²⁺-Einstroms wie in A375 und ebenso blieb dieser aus, wenn EGTA der Badlösung zugesetzt wurde beziehungsweise konnte mit HC-067047 vollständig inhibiert werden. Repräsentative Ca²⁺-Antworten individueller Zellen sind in Abbildung 3-21 A (Mel Im) und C (IGR1) gezeigt. Eine Zusammenfassung der kumulierten Ca²⁺-Signale nach Behandlung mit 1 μ M 4 α -PDD in Ca²⁺-freier HBSS-Lösung sowie in Anwesenheit von 5 μ M HC-067047 ist in Abbildung 3-21 B (Mel Im) und D (IGR1) zu finden. Die Menge des Ca²⁺-Einstroms (kumuliertes Ca²⁺-Signal) bezieht sich jeweils auf die Integration des F340/F380-Quotienten über 200 s und 350 s nach Applikationsbeginn sowie abzüglich der Grundlinie vor Applikation von 4 α -PDD. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM (Mel Im: 4 α -PDD allein: 273,5 \pm 30,0 AU; 4 α -PDD in Ca²⁺-freiem HBSS: -4,3 \pm 0,7 AU; 4 α -PDD mit HC-067047: 2,6 \pm 0,9 AU; Abb. 3-21 B; und IGR1: 4 α -PDD allein: 394,8 \pm 37,0 AU; 4 α -PDD in Ca²⁺-freiem HBSS: -7,2 \pm 1,4 AU; 4 α -PDD mit HC-067047: -1,7 \pm 0,7 AU; Abb. 3-21 D). Alle drei Melanomlinien zeigten bei Zugabe von 4 α -PDD einen deutlichen Ca²⁺-Einstrom. Es bestand jedoch keine klare Korrelation zwischen mRNA-Menge und dem kumulierten Ca²⁺-Signal.

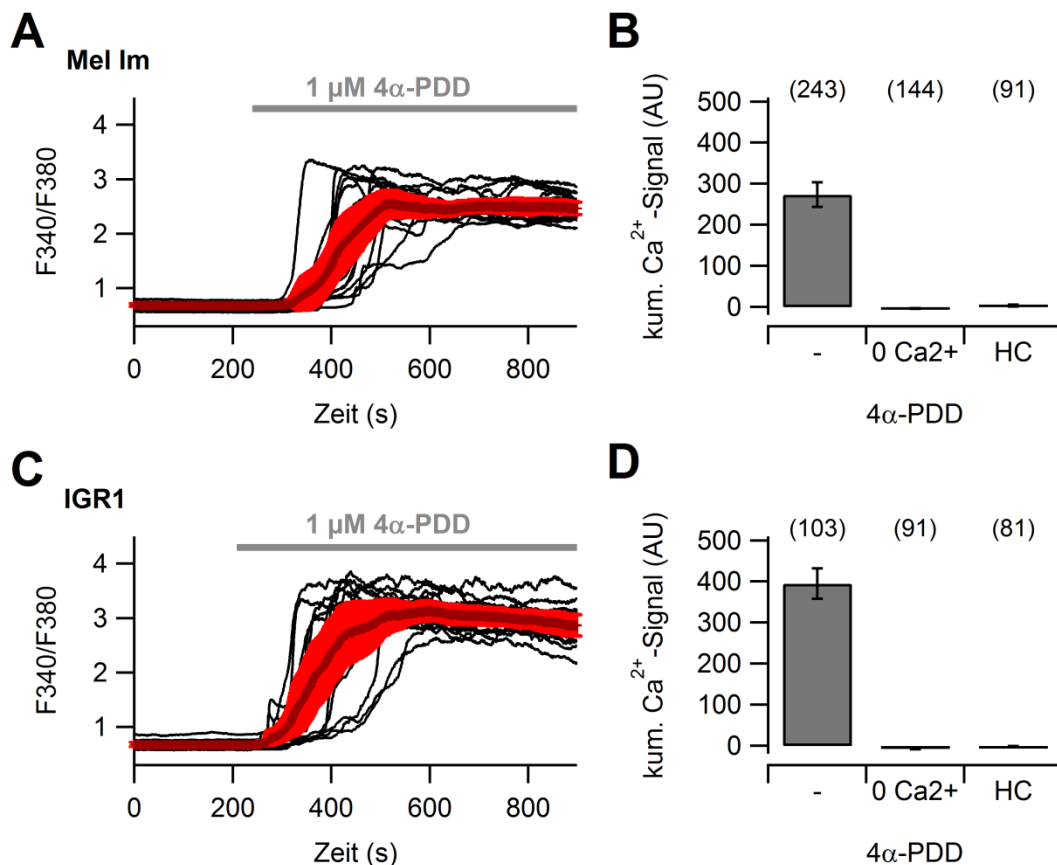


Abbildung 3-21: Funktionelle Expression von TRPV4 in Mel Im- und IGR1-Zellen. Mit Fura-2 beladene Mel Im- und IGR1-Zellen wurden mithilfe der Calcium-Imaging-Methode untersucht. Änderungen von $[Ca^{2+}]_i$ sind als F340/F380-Quotient dargestellt. Alle Messungen wurden in 2 mM Ca^{2+} -HBSS-Puffer durchgeführt. Die TRPV4-Aktivierung erfolgte durch extrazelluläre Zugabe von 1 µM 4α-PDD. (**A**, **C**) Gezeigt ist jeweils exemplarisch der durch 4α-PDD induzierte Ca^{2+} -Einstrom in Mel Im- (**A**) und IGR1-Zellen (**C**). Gezeigt sind die Zeitverläufe einzelner Zellen und deren Mittelwert (dunkelrot) mit einem Konfidenzintervall von 95% (hellrot). (**B**, **D**) Zusammenfassung der Experimente mit 4α-PDD und 5 µM HC-067047 (HC) beziehungsweise 4α-PDD in Ca^{2+} -freiem HBSS (0 Ca^{2+}) im Vergleich zur Kontrolle 4α-PDD allein (-) für Mel Im (**B**) und IGR1 (**D**). Berechnet wurden die kumulierten Ca^{2+} -Einstrome über einen Zeitraum von 200 s und 350 s nach Applikationsbeginn. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in Klammern angegeben und stammt jeweils aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Auch in HEK 293 stieg $[Ca^{2+}]_i$ nach Behandlung mit 4α-PDD in einigen Experimenten an. Dabei war der Ca^{2+} -Einstrom abhängig von der jeweiligen Zellcharge (Abb. 3-22 A und B) und insgesamt deutlich schwächer als in den Melanomlinien (HEK 293: $117,1 \pm 25,9$ AU; A375: $297,7 \pm 23,1$ AU; Mel Im: $273,5 \pm 30,0$ AU; IGR1: $394,8 \pm 37,0$ AU; unabhängiger Zweistichproben-t-Test; $P < 0,001$; Abb. 3-22 C). Eine Expression von *TRPV4* in HEK 293-Zellen bestätigten jedoch die mRNA-Daten. Für eine Charge wie in Abb. 3-22 A, die im Wesentlichen keine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von 1 µM 4α-PDD zeigte, konnte auch kein mRNA-Signal für *TRPV4* nachgewiesen werden. Für eine Charge mit deutlicher Ca^{2+} -Antwort, wie in Abb. 3-22 B dargestellt, ergab sich ein mRNA-Signal von 0,0037 (normiert auf β-Aktin).

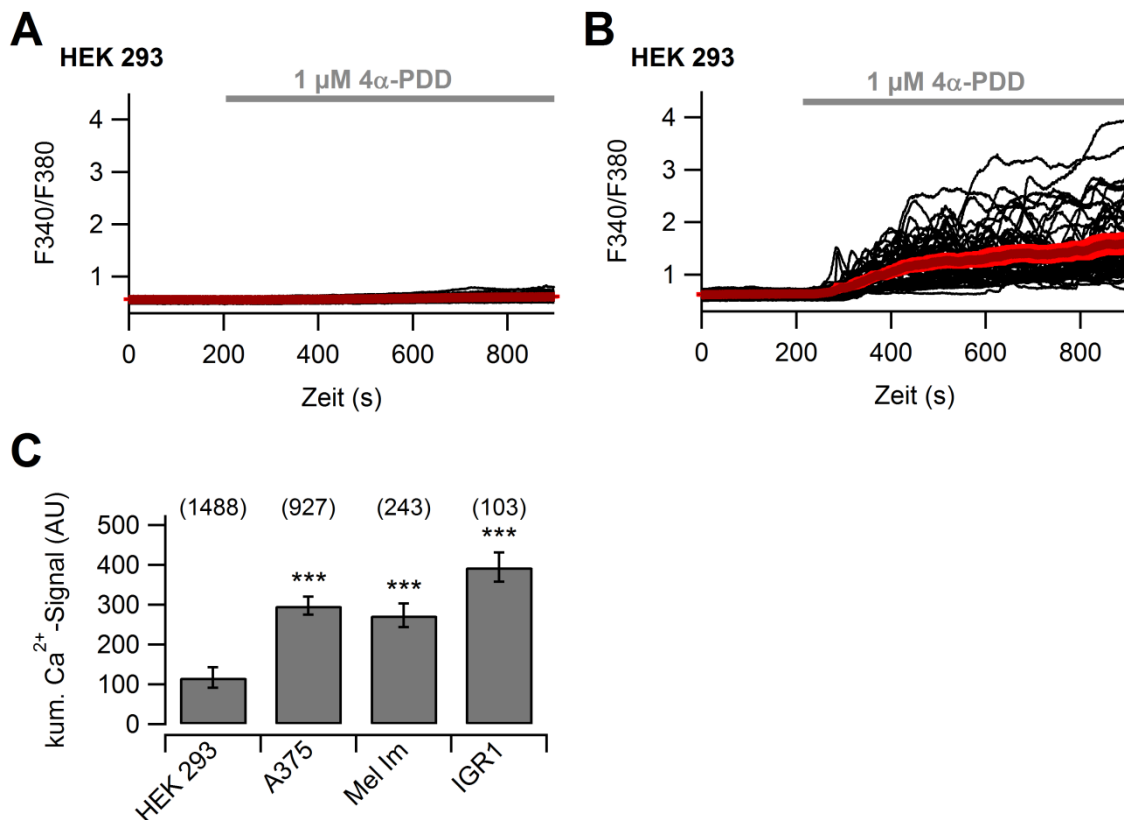


Abbildung 3-22: Funktionelle Expression von TRPV4 in HEK 293-Zellen. Mit Fura-2 beladene HEK 293-Zellen wurden mithilfe der Calcium-Imaging-Methode untersucht. Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ sind als F340/F380-Quotient dargestellt. Alle Messungen wurden in 2 mM Ca^{2+} -HBSS-Puffer durchgeführt. Die TRPV4-Aktivierung erfolgte durch extrazelluläre Zugabe von 1 μ M 4 α -PDD. **(A und B)** Gezeigt ist jeweils exemplarisch der durch 4 α -PDD induzierte Ca^{2+} -Einstrom in zwei verschiedenen Chargen von HEK 293-Zellen. Gezeigt sind die Zeitverläufe einzelner Zellen und deren Mittelwert (dunkelrot) mit einem Konfidenzintervall von 95% (hellrot). **(C)** Vergleich der kumulierten Ca^{2+} -Signale (AU) nach Zugabe von 1 μ M 4 α -PDD über einen Zeitraum von 200 s in Melanomzelllinien und HEK 293-Zellen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM. Die Anzahl der Zellen ist in Klammern angegeben und stammt jeweils aus mindestens vier unabhängigen Experimenten. Unabhängiger Zweistichproben-t-Test, *** $P < 0,001$.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aktive TRPV4-Kanäle in Melanomzellen durch mehrere unabhängige Evidenzen bestätigt werden konnten. Zwei verschiedene Agonisten lösten jeweils eine deutliche Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ aus. Der durch 4 α -PDD ausgelöste $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg trat dabei nur auf, wenn Ca^{2+} in der extrazellulären Lösung vorhanden waren und er konnte durch den TRPV4-Antagonisten HC-067047 vollständig inhibiert werden.

Da auch einige Chargen an HEK 293 mit einem Ca^{2+} -Einstrom auf 4 α -PDD reagierten, waren sie als Modellsystem für eine heterologe Expression von TRPV4 mit und ohne KCa3.1 und damit zur Untersuchung eines Einflusses von KCa3.1 auf TRPV4-vermittelten Ca^{2+} -Antworten ungeeignet.

3.2.6 KCa3.1 und TRPV4

Jin et al. zeigten in einer Arbeit an Nierenzellen (Jin et al., 2012), dass sich TRPV4 und Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle gegenseitig beeinflussen können und so einen gesteigerten Ca^{2+} -Einstrom in renalen Sammelrohr-Zellen bewirken. Wenn Ca^{2+} durch TRPV4-Kanäle ins Cytosol einströmt, werden KCa2 -Kanäle (SK) und bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen auch KCa1.1 -Kanäle (BK) aktiviert. Der K^+ -Ausstrom durch diese Kanäle verhindert eine Depolarisation der Plasmamembran und verstärkt damit den Ca^{2+} -Einstrom. Erst kürzlich wurde zudem von Qian et al. eine analoge Wechselwirkung zwischen den KCa3.1 -Kanälen und dem TRPV4-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom nachgewiesen (Qian et al., 2014). Es sollte nun untersucht werden, ob Blockade von KCa3.1 auch in Melanomlinien einen Einfluss auf den TRPV4-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom hat. Dazu wurden die Zellen vor und während der Applikation von $1\ \mu\text{M}$ 4α -PDD mit $10\ \mu\text{M}$ TRAM-34 behandelt. Wie in Abb. 3-23 gezeigt, führte die Applikation des KCa3.1 -Blockers TRAM-34 zu einer signifikanten Reduktion des mit 4α -PDD induzierten Ca^{2+} -Einstroms von $297,7 \pm 23,1\ \text{AU}$ auf $82,9 \pm 7,5\ \text{AU}$ in A375 und von $273,5 \pm 30,0\ \text{AU}$ auf $148,1 \pm 28,5\ \text{AU}$ in Mel Im (unabhängiger Zweistichproben-t-Test; $P < 0,001$; Abb. 3-23 C). In Abbildung 3-23 A und B sind jeweils die Ca^{2+} -Antworten einzelner Zellen mit und ohne TRAM-34 vom gleichen Messtag dargestellt. In beiden Linien führte also eine Hemmung von KCa3.1 durch TRAM-34 zu einer deutlichen und signifikanten Reduzierung des Ca^{2+} -Einstroms über TRPV4-Kanäle.

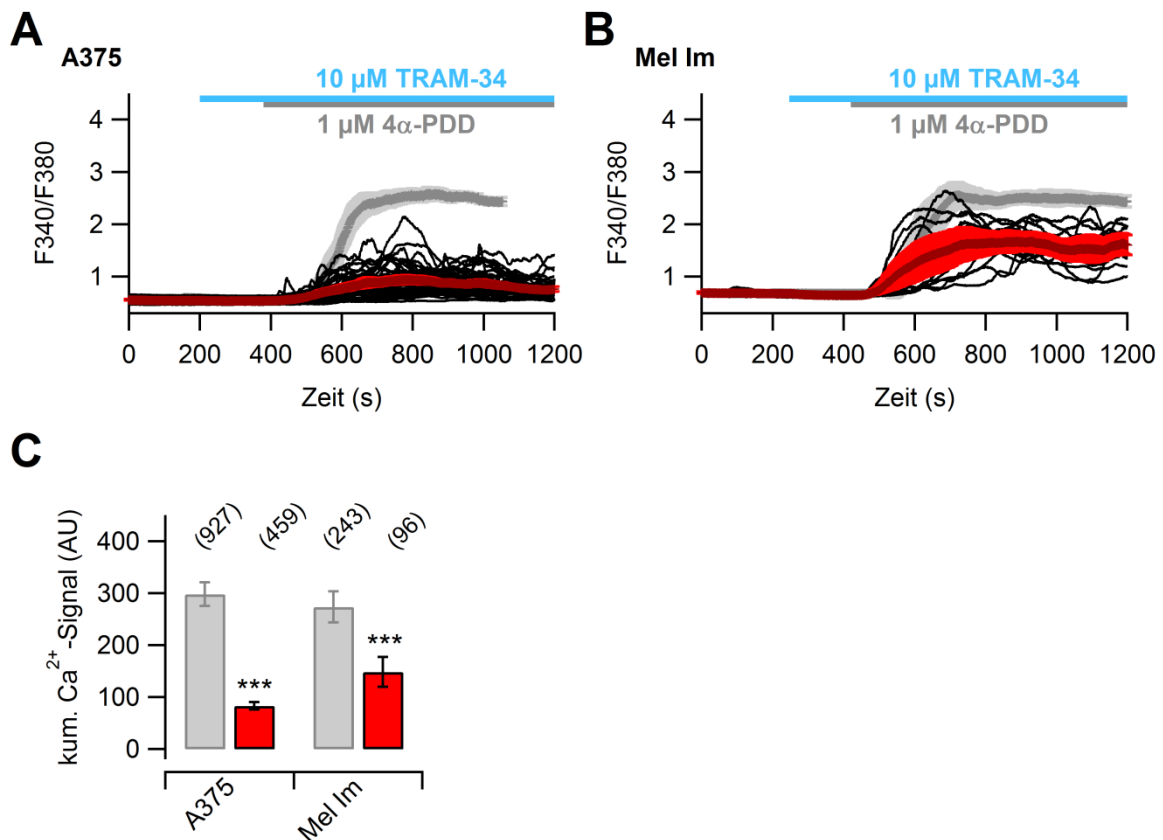


Abbildung 3-23: Reduktion TRPV4-abhängiger Ca^{2+} -Eintröme in Melanomzelllinien durch den KCa3.1-Inhibitor TRAM-34. Mit Fura-2 beladene A375- und Mel Im-Zellen wurden mithilfe der Calcium-Imaging-Methode untersucht. Alle Messungen wurden in 2 mM Ca^{2+} -HBSS-Puffer durchgeführt. **(A)** Ca^{2+} -Signale (F340/F380-Quotient) in A375-Zellen in Reaktion auf 1 μM 4 α -PDD in Gegenwart des KCa3.1- Inhibitors TRAM-34 (10 μM , orange) sind als Einzelverläufe (schwarz) und als Mittelwertskurve (rot) mit Konfidenzintervall von 95% (hellrot) dargestellt. Überlagert abgebildet ist die Mittelwertskurve (grau) mit Konfidenzintervall (hellgrau) von Kontrollzellen am gleichen Messtag (4 α -PDD ohne TRAM-34). **(B)** Analoges Experiment wie in A, durchgeführt mit Mel Im-Zellen. **(C)** Vergleich 4 α -PDD-induzierter Ca^{2+} -Eintröme (AU) über einen Zeitraum von 200 s, mit (rot) und ohne (hellgrau) 10 μM TRAM-34 in A375- und Mel Im-Zellen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM. Die Anzahl der Zellen ist in Klammern angegeben und stammt aus je acht (A375) und fünf (Mel Im) unabhängigen Experimenten. Unabhängiger Zweistichproben-t-Test, *** $P < 0,001$.

3.3 Einfluss des TRPV4-Blockers HC-047067 auf die Proliferation und Migration von Melanomzellen

Für den Kaliumkanal KCa3.1, dessen Hemmung die Proliferation von Melanomzellen reduziert (Tajima et al., 2005; Buttstädt et al., unveröffentlicht), wird angenommen, dass er indirekt über Beeinflussung der Ca^{2+} -Homöostase wirkt. Wenn dies zutrifft, sollte folglich auch die direkte Hemmung von Ca^{2+} -Kanälen einen Einfluss auf die Zellproliferation oder andere Zelleigenschaften haben. Um dies zu überprüfen, wurden Melanomzellen mit dem TRPV4-Blocker HC-067047 behandelt und ihre Proliferations- und Migrationseigenschaften untersucht.

In MTT-Assays wurde die Proliferation von A375-Zellen und Mel Im-Zellen in Gegenwart von HC-067047 untersucht. Es wurden dazu Konzentrationen von 5 μ M bis 60 μ M HC-067047 eingesetzt und wie in Abbildung 3-24 A gezeigt, kam es zu einer dosisabhängigen Reduzierung der Zellproliferation. Während 5 μ M des TRPV4-Blockers nur zu einer marginalen Senkung der Proliferation ($91,1 \pm 3,1\%$ gegenüber DMSO-Kontrolle) führte, nahm der proliferationshemmende Effekt von HC-067047 im Bereich von 10 μ M bis 30 μ M signifikant zu (10 μ M: $82,9 \pm 2,4\%$; 20 μ M: $66,7 \pm 6,5\%$; 30 μ M: $56,1 \pm 10,3\%$; unabhängiger Zweistichproben-t-Test; $P < 0,05$ und $P < 0,01$; Abb. 3-24 A). Die weitere Erhöhung der Konzentration auf 60 μ M reduzierte die Proliferation von A375-Zellen nur noch geringfügig. Die Proliferation betrug hier etwa 50% im Vergleich zur Proliferation der DMSO-Kontrolle (40 μ M: $53,6 \pm 9,7\%$; 60 μ M: $52,8 \pm 10,4\%$; Abb. 3-24 A). Analoge Experimente mit Mel Im-Zellen ergaben sehr ähnliche Effekte. Während bei 5 und 10 μ M nur eine marginale Hemmung der Proliferation sichtbar war (5 μ M: $95,9 \pm 3,0\%$; 10 μ M: $90,1 \pm 3,5\%$; Abb. 3-24 B), konnte bei Konzentrationen ab 20 μ M eine signifikante und dosisabhängige Reduktion der Proliferation beobachtet werden (20 μ M: $76,5 \pm 3,6\%$; 30 μ M: $67,8 \pm 4,7\%$; 40 μ M: $60,5 \pm 5,0\%$; 60 μ M: $49,8 \pm 5,4\%$; unabhängiger Zweistichproben-t-Test; $P < 0,05$ und $P < 0,01$; Abb. 3-24 B).

Die relativ schnelle Proliferation von Tumorzellen kann möglicherweise einen aggressiven Verlauf einer Krebserkrankung fördern. Von großer Bedeutung für die Ausbreitung von Tumorzellen ist aber auch deren Mobilität, die *in vitro* durch verschiedene experimentelle Ansätze getestet werden kann. Abbildung 3-25 zeigt Ergebnisse zur Migration von Mel Im-Zellen im sogenannten Transwell-Assay. Dabei werden Zellen auf einer porösen Trennfläche angesiedelt und ihre Wanderung durch die Poren auf die andere Seite quantifiziert. Zur Stimulation der Migration wurden die Zellen auf der Oberseite der Kammern serumfrei eingesetzt, während das Medium auf der Zielseite serumhaltig war. Sowohl Mel Im- als auch A375-Zellen waren in der Lage, im Messzeitraum von vier Stunden durch die Poren zu migrieren. Der Einfluss von TRPV4 auf die Migration wurde durch Zugabe von steigenden Konzentrationen an HC-067047 bestimmt. Als Kontrolle diente DMSO. Wie in Abbildung 3-24 gezeigt, wurde die Migration der Mel Im-Zellen durch den Kanalinhitor deutlich beeinträchtigt. Bereits 10 μ M HC-067047 senkte die Migration um fast 50% ($54,6 \pm 8,6\%$; Abb. 3-24 C) und 40 μ M reduzierten die Migration auf knapp 30% im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen ($30,7 \pm 5,5\%$; Abb. 3-24 C). Auch in A375 konnte eine deutliche Reduktion der Migration durch HC-067047 beobachtet werden (10 μ M: $77,1 \pm 5,5\%$; 40 μ M: $46,3 \pm 7,8\%$; Abb. 3-24 E).

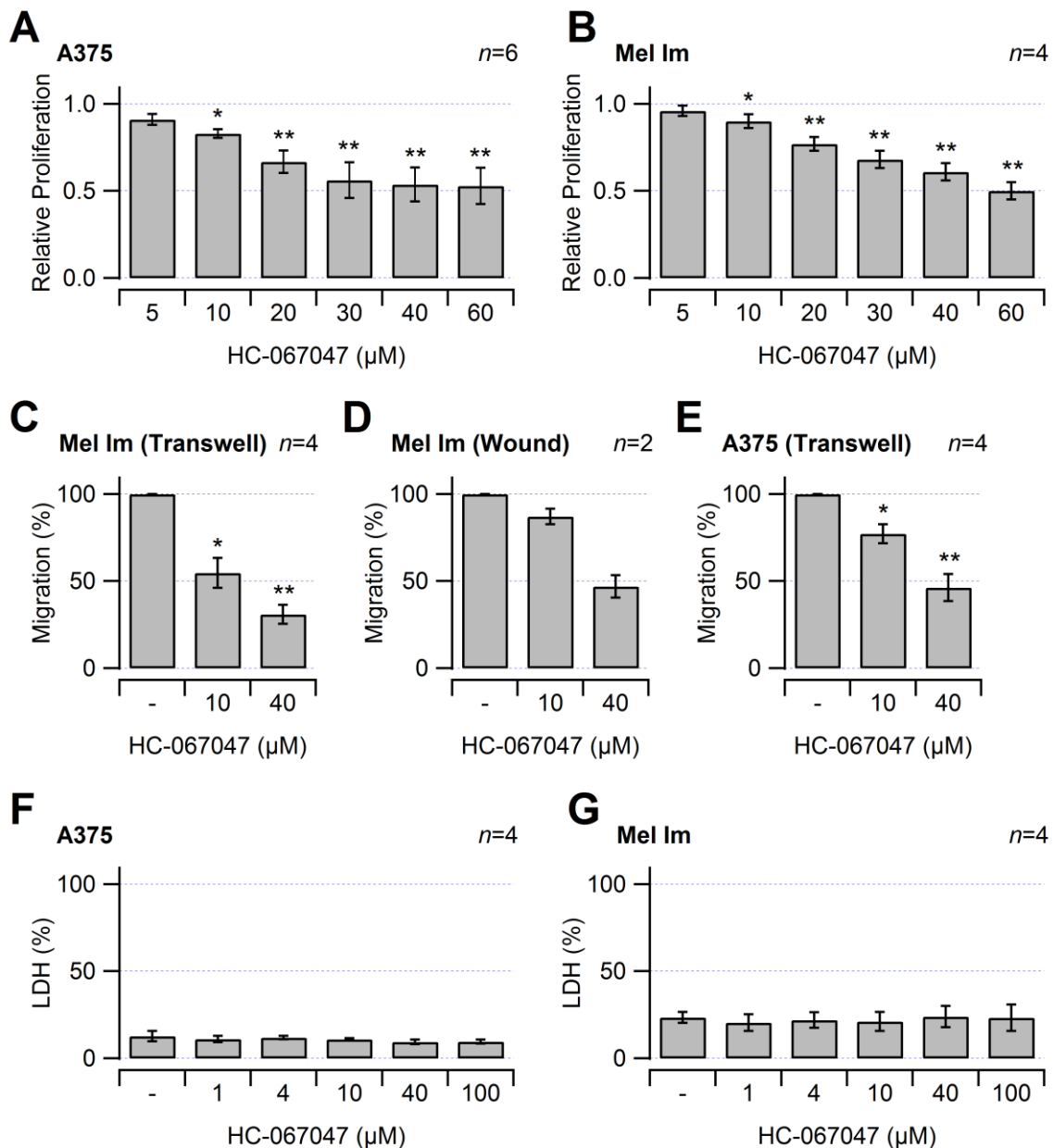


Abbildung 3-24: Der TRPV4-Blocker HC-067047 vermindert die Proliferation und Migration von Melanomzelllinien und ist nicht toxisch. (A, B) Untersuchung der Zellproliferation (MTT Assay) von A375-Zellen (A) und Mel Im-Zellen (B) in Abhängigkeit des TRPV4-Inhibitors HC-067047. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM, normiert auf DMSO-behandelte Zellen. n =Anzahl unabhängiger Experimente. (C-E) Untersuchung der Migration von Mel Im- und A375-Zellen in Abhängigkeit von der TRPV4-Aktivität. Bestimmung der Migration mittels Transwell-Assay (Transwell) und *wound healing*-Assay (Wound) in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen an HC-067047 in Mel Im- (C und D) und A375-Zellen (E). Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM, normiert auf DMSO-behandelte Zellen (-). n =Anzahl unabhängiger Experimente. (F, G) Untersuchung der Toxizität des TRPV4-Blockers HC-067047 in A375-Zellen (F) und Mel Im-Zellen (G). Bestimmung der Toxizität (LDH-Freisetzung) in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen an HC-067047 und im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen (-). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM, normiert auf vollständig lysierte Zellen nach Behandlung mit 1% Triton X-100. n =Anzahl unabhängiger Experimente. Unabhängiger Zweistichproben-t-Test, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

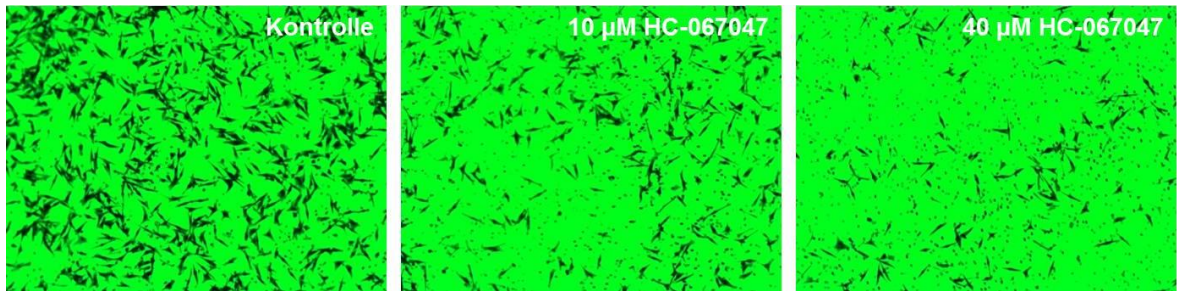


Abbildung 3-25: Reduktion der Migration von Mel Im-Zellen durch den TRPV4-Inhibitor HC-067047. Repräsentative Bilder migrierter Mel Im-Zellen im Transwell-Assay. Circa 90% konfluente Mel Im-Zellen wurden für 24 h in FKS-freiem Medium gehungert, dann $5 \cdot 10^4$ Zellen in Transwell-Kammern ausgesät und für 4 h mit DMSO oder dem Blocker behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und angefärbt. Von links nach rechts: mit DMSO (Kontrolle) sowie mit 10 μ M und 40 μ M HC-067047 behandelte Mel Im-Zellen.

Die migrationshemmende Wirkung von HC-067047 auf Mel Im-Zellen konnte zusätzlich in *wound healing*-Assays bestätigt werden. Hierzu wurden schmale Streifen in einem konfluent bewachsenen Zellrasen freigeschabt und die Geschwindigkeit des Schließens dieser „Wunde“ an Serien von lichtmikroskopischen Fotos bestimmt. Der Effekt war hier geringer als in den Transwell-Experimenten, dennoch war eine klare Migrationsreduktion erkennbar (10 μ M: $87,1 \pm 4,5\%$; 40 μ M: $47,0 \pm 6,5\%$; Abb. 3-24 D). Mit A375-Zellen verlief der Wundverschluss nur sehr langsam, sodass mit diesem Assay keine Trennung zwischen Zellteilungen und Zellmigration möglich gewesen wäre.

Um auszuschließen, dass die Reduktion der Proliferation und Migration durch eine allgemein toxische Wirkung von HC-067047 hervorgerufen wurde, wurden Zellvitalitäts-Tests durchgeführt, die auf der Freisetzung des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) aus geschädigten Zellen beruhen. Normiert wurde der maximal zu erwartende Effekt auf die LDH-Freisetzung durch das membranschädigende Detergenz 1% Triton X-100. Wie in Abbildung 3-24 gezeigt, lag die LDH-Aktivität im Überstand von Mel Im-Zellen (Abb. 3-24 G) höher als bei A375-Zellen (Abb. 3-24 F). In beiden Zelllinien war die freigesetzte LDH-Menge aber völlig unbeeinflusst von HC-067047, selbst bei einer maximalen Konzentration von 100 μ M. Damit kann man davon ausgehen, dass der Effekt des Kanalinhibitors auf Proliferation und Migration nicht auf ein Absterben der Zellen zurückzuführen ist.

4 Diskussion

Krebszellen entwickeln vielfältige Mechanismen, um ungehindert zu proliferieren, Apoptosesignalen zu entgehen oder in andere Gewebe einzuwandern (Hanahan und Weinberg, 2011). Calciumionen spielen hier eine zentrale Rolle und sind an den meisten Prozessen beteiligt (Parkash und Asotra, 2010). In Krebszellen kommt es meist aufgrund einer veränderten Expression, Aktivität oder einer veränderten Lokalisation von Ca^{2+} -Transportproteinen wie Ionenkanälen und Pumpen im Vergleich zu gesunden Zellen zu einer Modifikation der Ca^{2+} -Homöostase (Monteith et al., 2012). Eine Veränderung des Ca^{2+} -Haushalts kann den Krebszellen die Fähigkeit geben, stärker zu proliferieren oder ihren Ursprungsort zu verlassen und in andere Gewebe zu migrieren. Eine veränderte Expression von Ca^{2+} -Kanälen kann so zum Beispiel Einfluss auf die proliferationsfördernden oder migrationsfördernden Eigenschaften von Krebszellen nehmen. Welche Proteine die Ca^{2+} -Homöostase in Melanomzellen beeinflussen, ist noch weitestgehend unbekannt. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, Ca^{2+} -Kanäle zu finden, die den Ca^{2+} -Einstrom in Melanomzellen erlauben.

4.1 Ca^{2+} -Kanäle in Melanomlinien

4.1.1 CRAC-Kanäle in Melanomlinien

Einer der wichtigsten Wege für den Ca^{2+} -Einstrom in nicht-erregbaren Zellen ist der über CRAC-Kanäle. Wie einleitend schon näher beschrieben, fungieren STIM-Proteine im ER als Ca^{2+} -Sensoren, die in direktem Kontakt mit den porenbildenden Untereinheiten ORAI in der Plasmamembran stehen. Bei Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER-Lumen wird durch STIM eine Öffnung der ORAI-Kanäle induziert und der sogenannte *calcium release-activated calcium* (CRAC)-vermittelte Strom führt zu einer starken Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Dieser Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran wird auch als *store-operated Ca^{2+} entry* oder SOCE bezeichnet (Putney, 1986; Putney, 1990; Hoth und Penner, 1992; Jairaman und Prakriya, 2013).

Eine große Rolle spielen CRAC-Kanäle im Immunsystem, wo ihre Funktion bereits sehr gut untersucht wurde (Roberts-Thomson et al., 2010). Die Bedeutung von CRAC-Kanälen bei der Tumorentstehung und -entwicklung ist hingegen noch ein recht junges Forschungsgebiet. Eine erhöhte Expression der Komponenten ORAI1 und STIM1 wurde in Brustkrebszellen festgestellt und steht im Zusammenhang mit einer schlechten Prognose (McAndrew et al., 2011). ORAI1 und STIM1 sind hier relevant für Migration, Invasion und Metastasierung der Brustkrebszellen (Yang et al., 2009). In einigen weiteren Krebsarten wurde eine Hyperaktivität von SOCE und ein damit

verbundenes Fortschreiten der Krankheit beobachtet (Chen et al., 2011; Chantome et al., 2013; Wang et al., 2014). Es stellt sich daher die Frage, ob CRAC-Kanäle auch in Melanomzellen den Ca^{2+} -Einstrom ermöglichen. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, da CRAC-Kanäle ubiquitär vorkommen (Lewis, 2011) und in einer Studie von Allen und Kollegen in mehreren Melanomlinien ein CRAC-vermittelter Strom bereits beobachtet wurde (Allen et al., 1997). Daher wurden die hier bearbeiteten Melanomlinien hinsichtlich der Expression und Aktivität von CRAC-Kanalproteinen untersucht und mit HEK 293, einer nicht-melanozytären Zelllinie, verglichen.

Tatsächlich konnte mittels quantitativer *real-time* PCR eine Expression von CRAC-Proteinen in allen drei untersuchten Melanomlinien (A375, IGR1 und Mel Im) festgestellt werden. Die Expression der einzelnen Komponenten *ORAI1* und *ORAI2* sowie *STIM1*, *STIM2* und *STIM3* in den Melanomlinien unterschied sich dabei nicht von der in HEK 293-Zellen. Auch zwischen den einzelnen Melanomlinien konnten keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der mRNA-Level verzeichnet werden. Damit scheinen die Komponenten der CRAC-Kanäle sowohl in Melanomzellen als auch in HEK 293-Zellen transkribiert zu sein.

Von größerer Bedeutung als das Vorkommen von mRNA ist die Frage, ob diese Komponenten auch funktionelle CRAC-Kanäle generieren. Mittels der Calcium-Imaging-Methode konnte eine starke funktionelle Expression von CRAC-Kanälen in den untersuchten Melanomlinien nachgewiesen werden. Als klassischer Nachweis der Kanalaktivität wurde Thapsigargin (TG) zum Entleeren der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher verwendet. Dies führte zu einem starken Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, welcher mit dem CRAC-Blocker 2-APB fast vollständig inhibiert werden konnte. Der so nachweisbare Ca^{2+} -Einstrom war in den beiden untersuchten Melanomlinien wesentlich ausgeprägter als in den vergleichend untersuchten HEK 293-Zellen. Dies steht im Einklang mit bereits publizierten Daten; in mehreren Arbeiten ist in HEK 293-Zellen mRNA der CRAC-Komponenten detektiert worden, es konnten aber nur geringe endogene CRAC-Ströme gemessen werden (Roos et al., 2005; Vig et al., 2006; Gwack et al., 2007; Zhang et al., 2008).

Da sich HEK 293 und die Melanomlinien hinsichtlich ihrer mRNA-Level nicht unterschieden, ist die verschiedene Aktivität von CRAC möglicherweise auf eine post-transkriptionelle oder post-translationale Regulation der CRAC-Komponenten zurückzuführen. Eine Bestimmung der Proteinmenge in der Zellmembran könnte aufzeigen, ob der stärkere Ca^{2+} -Einstrom durch eine größere Zahl an CRAC-Kanälen in den Melanomlinien zustande kommt. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre die Regulation der CRAC-Aktivität durch Interaktionspartner, die CRAC modifizieren können (Srikanth et al., 2013). Zusätzlich kann eine erhöhte CRAC-Aktivität in Melanomzellen gegenüber HEK 293-Zellen auch rein biophysikalisch begründet sein,

unabhängig von der Proteinmenge und Regulation. Da der Ca^{2+} -Einstrom in eine Zelle von der elektrochemischen Triebkraft abhängt, können auch K^{+} -Kanäle oder andere Ionenkanäle, die ein negativeres Membranpotential bewirken, indirekt für einen stärkeren Ca^{2+} -Einstrom durch Hyperpolarisation der Zellmembran verantwortlich sein. Diese Möglichkeit wird später noch eingehender betrachtet (siehe Abschnitt 4.3.3). Dass die Stärke des Ca^{2+} -Einstroms nicht unbedingt mit einer höheren CRAC-Expression zusammenhängen muss, hatten bereits Untersuchungen von Maus-Melanomzellen gezeigt. Hier war in malignen Maus-Melanomzellen gegenüber nicht-malignen Mauszellen ein robustes SOCE-Signal zu verzeichnen, jedoch ohne eine Überexpression von Orai1 und Stim1 in den malignen Mauszellen detektieren zu können (Feldman et al., 2010).

Die hier vorgestellten funktionellen Nachweise von CRAC-Aktivität machen deutlich, dass diese Kanalkomponenten als Modulatoren der zellulären Ca^{2+} -Homöostase in Melanomzellen in Betracht gezogen werden müssen. Dies ist besonders interessant im Hinblick auf eine aktuelle Untersuchung, die zeigte, dass die Proteinmengen von ORAI1 und STIM1 in primären und metastatischen Melanomzellen im Vergleich zu gesunden, humanen, epidermalen Melanozyten erhöht sind (Sun et al., 2014). In einer weiteren, erst kürzlich veröffentlichten Studie wurde dagegen eine Überexpression von ORAI1 und STIM2 beobachtet (Stanisz et al., 2014). Damit scheint es möglicherweise kein einheitliches Muster der CRAC-Zusammensetzung in Melanomzellen zu geben. siRNA-Daten belegen aber, dass die Regulation der Ca^{2+} -Homöostase durch CRAC-Kanäle für die Proliferation und Migration von Melanomzellen bedeutsam ist (Stanisz et al., 2014). Damit wäre der Einsatz von Inhibitoren der CRAC-Kanäle als therapeutische Strategie für das Melanom grundsätzlich denkbar.

Auch für andere Tumortypen wird gegenwärtig eine therapeutische Intervention durch Blocker von CRAC-Kanälen diskutiert. In humanen Glioblastomzellen wurde eine Überexpression von ORAI1 und STIM1 nachgewiesen und der Knockdown von ORAI1 oder STIM1 durch RNA-Interferenz führte zu einer reduzierten Invasivität der humanen Glioblastomzellen (Motiani et al., 2013). Bei Brustkrebsbiopsien stellte sich eine Überexpression von ORAI3 in mehr als 75% der Patientenproben heraus. Eine Herabregulation von ORAI3 resultierte in Zellzyklusarrest, Verringerung der Proliferation und Induktion der Apoptose. In gesunden epithelialen Brustzellen blieb dieser Effekt dagegen aus (Faouzi et al., 2011; Faouzi et al., 2013).

Da CRAC-Kanäle nahezu ubiquitär in allen Geweben des Körpers vorkommen (Lewis, 2011) und zur Zeit keine sehr spezifischen und potenten Blocker existieren (Derler et al., 2008; Jairaman und Prakriya, 2013), CRAC-Kanäle zudem auch andere lebenswichtige Funktionen haben und besonders auch in Immunreaktionen involviert sind, die bei der Beseitigung von Melanomzellen wünschenswert sind, ist die Erfolgsaussicht einer therapeutischen Interventionsstrategie zumindest

fraglich. Es bleibt also die Frage, ob weitere Proteine in Melanomzellen identifiziert werden können, die Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase haben und die möglicherweise weniger breit exprimiert sind.

4.1.2 TRP-Kanäle in Melanomlinien

Neben CRAC-Kanälen kommen als spannungsunabhängige Ca^{2+} -Kanäle auch TRP-Kanäle für einen Ca^{2+} -Einstrom in Melanomzellen in Frage. Eine veränderte Expression von TRP-Kanälen und ein damit verbundener Beitrag zur Malignität wurde bereits für verschiedene Krebsarten beschrieben (Prevorskaya et al., 2007).

Kanäle mit einer sehr ausgeprägten Selektivität für Ca^{2+} finden sich besonders in der Unterfamilie TRPV. Für die Kanäle TRPV5 und TRPV6 wurde eine etwa einhundertfache Präferenz für Ca^{2+} gegenüber Na^+ beobachtet (Owsianik et al., 2006). Für TRPV6 konnte eine proliferationsfördernde Wirkung in der Prostatakrebslinie LnCaP aufgezeigt werden und der ebenfalls in diesen Zellen exprimierte Kaliumkanal KCa3.1 ermöglicht dort durch Hyperpolarisation des Membranpotentials einen besonders starken Ca^{2+} -Einstrom über TRPV6 (Lallet-Daher et al., 2009). Weitere Nachweise für eine Expression von TRPV-Kanälen sind beschrieben für Prostata-, Pankreas-, Kolon-, Blasen- oder auch Brustkrebszellen (Prevorskaya et al., 2007).

Eine weitere große Kanalgruppe mit nachgewiesener Expression in Krebszellen ist die TRPC-Unterfamilie. Die TRPC-Unterfamilie umfasst sowohl Kanäle mit erkennbarer Ca^{2+} -Selektivität, wie TRPC5 und TRPC6, als auch unselektive Kationenkanäle wie TRPC1 und TRPC4 (Owsianik et al., 2006). Erhöhte Expression von TRPC1, TRPC4 und TRPC6 wurde in Prostatakrebszellen beobachtet (Vanden Abeele et al., 2003; Vanden Abeele et al., 2004; Thebault et al., 2006). TRPC-Kanäle sind darüber hinaus in Lungenkrebs-, Brustkrebs-, Eierstockkrebs- und Leberkrebs- sowie Glioblastomzellen nachgewiesen worden. Sie sind die wohl am häufigsten aufgefundenen TRP-Kanäle, für die eine Bedeutung bei der Tumorprogression und eine proliferationsfördernde Wirkung diskutiert werden (Chen et al., 2014). Daher wurden die Melanomlinien A375, IGR1 und Mel Im zunächst auf das Vorkommen von mRNA von allen Vertretern der TRPV- und TRPC-Unterfamilie untersucht.

Die Bestimmung der mRNA-Level für TRPC-Kanäle in den Melanomlinien mittels quantitativer *real-time* PCR zeigte, dass die Gene *TRPC1* und *TRPC3-6* in den Melanomlinien niedriger exprimiert waren als in den nicht-melanozytären HEK 293-Zellen. Nur *TRPC7* war in allen Linien etwa gleich stark exprimiert. Das Gen *TRPC2* wurde nicht untersucht, da es im Menschen nur als Pseudogen vorliegt (Wes et al., 1995). Der mRNA-Gehalt in Zelllinien lässt sich zuverlässig testen und ist gut quantifizierbar. Dabei macht man aber sehr häufig die Erfahrung, dass sich für ein

untersuchtes Gen ein Transkript mittels PCR nachweisen lässt, auch wenn Proteinanalysen oder funktionelle Nachweise an den untersuchten Zellen negativ bleiben. Dies begründet sich in der sehr niedrigen Nachweisgrenze von PCR-Reaktionen, durch die sich mRNA-Konzentrationen über einen Bereich mehrerer logarithmischer Größenordnungen nachweisen lassen, theoretisch bis hin zum Nachweis einzelner Moleküle. Eine RT-PCR-Analyse kann daher als Voruntersuchung dienen, ersetzt aber nicht weitere Nachweise auf Proteinebene.

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Expressionsstudie für die TRPC-Familie schließen das Vorkommen von TRPC-Kanälen nicht vollständig aus, der Vergleich mit HEK 293-Zellen lässt eine solche Expression aber sehr unwahrscheinlich erscheinen. HEK 293-Zellen werden weltweit häufig zur heterologen Expression von Kanälen und insbesondere auch von Kanälen der TRP-Familien eingesetzt. Jede starke endogene Expression von TRP-Kanälen in dieser Zelllinie wäre bei solchen Studien bereits auffällig geworden. Nur für TRPC1-Kanäle wurde beschrieben, dass eine schwache endogene Expression in etwa 20% der Zellen dieser Linie nachweisbar ist (Skopin et al., 2013). Der Vergleich mit HEK 293 und die relativ geringere Expression in den untersuchten Melanomlinien sprechen daher gegen eine starke Expression von TRPC-Kanälen in Melanomzellen.

Die Bestimmung der mRNA-Level für die TRPV-Kanäle ergab, dass *TRPV6* in den untersuchten Melanomlinien zwar transkribiert wird, aber eine deutlich geringere Expression als die in HEK 293-Zellen aufwies. Ein ähnliches Bild zeigte sich für die mRNA von *TRPV3*. *TRPV5*-Transkripte konnten in keiner Melanomlinie detektiert werden. Eine Expression von *TRPV1*, *TRPV2* und *TRPV4* war dafür in allen drei Melanomlinien und HEK 293-Zellen zu finden. Dabei waren *TRPV2* und *TRPV4* in allen drei untersuchten Melanomlinien stärker exprimiert als in HEK 293. Um eine funktionelle Expression dieser drei TRPV-Vertreter nachzuweisen, wurden entsprechende Aktivatoren eingesetzt und mittels Calcium-Imaging geprüft, ob es zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Melanomlinien kommt. Es zeigte sich, dass sowohl für TRPV1 als auch für TRPV2 keine funktionelle Expression dieser TRP-Kanäle in den Melanomzellen zu verzeichnen war, da nach Applikation des TRPV1-Aktivators Capsaicin und des TRPV2-Aktivators Probenecid die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in den untersuchten Zellen konstant blieb. Ein Einfluss von TRPV1 und TRPV2 auf die Ca^{2+} -Homöostase über ihre Funktion als Ca^{2+} -Kanäle ist in den hier untersuchten Melanomlinien mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen.

TRPV4 wird durch Temperaturen über 25 °C, durch mechanische Stimuli wie Scherkräfte und hypotonisches Anschwellen von Zellen, sowie durch verschiedene synthetische und natürliche Liganden aktiviert (Watanabe et al., 2002; O'Neil und Heller, 2005; Everaerts et al., 2010). Mit den beiden spezifischen TRPV4-Aktivatoren GSK1016790A und 4 α -PDD konnte in allen untersuchten

Melanomlinien ein Ca^{2+} -Einstrom beobachtet werden, der sich zudem durch den spezifischen TRPV4-Inhibitor HC-067047 vollständig hemmen lässt. Damit war eine funktionelle Expression von TRPV4 eindeutig nachweisbar. Darüber hinaus zeigte sich, dass nicht nur die mRNA, sondern auch die einströmende Ca^{2+} -Menge in den Melanomlinien deutlich erhöht war im Vergleich zu HEK 293-Zellen. Letzteres könnte zum einen auf die stärkere Expression zurückzuführen sein, zum anderen aber auch durch weitere Proteine beeinflusst sein, zum Beispiel durch K^{+} -Kanäle, die durch Hyperpolarisation der Membran die Triebkraft für den Ca^{2+} -Einstrom erhöhen. Eine DNA-Sequenzierung des TRPV4-Kanals in A375-Zellen ergab keinen Hinweis auf eine Mutation des Kanalgenes (R. Schönherr, persönliche Mitteilung). Ob TRPV4 nun auch für die Progression des Melanoms wie zum Beispiel die Proliferation oder Migration von Bedeutung ist, wird im folgenden Abschnitt näher betrachtet.

Als Ursache für die gesteigerte Expression von TRPV4 in den untersuchten Melanomlinien könnte eine transkriptionelle Regulation durch die in den Melanomlinien häufig aktivierten onkogenen Signalwege, wie MAPK-Signalweg oder auch PI3-Kinase-Signalweg (Vultur et al., 2011; Sullivan und Flaherty, 2013) in Betracht gezogen werden. Für erste Studien in der eigenen Arbeitsgruppe zur Regulation der TRPV4-Expression wurden A375-Zellen als Modell verwendet (Sell, 2014). A375-Zellen exprimieren eine mutierte Form der Serin/Threonin-Proteinkinase BRAF mit einer Mutation von Valin an Position 600 zu Glutamat ($\text{BRAF}^{\text{V600E}}$), die etwa in der Hälfte aller malignen Melanome vorzufinden ist (Davies et al., 2002). Proliferation und Überleben der A375-Zellen hängt von dem konstitutiv aktivierten MAPK-Signalweg ab (Karasarides et al., 2004; Panka et al., 2006). Untersuchungen von Dustin Sell zeigten interessanterweise, dass der MAPK-Signalweg keinen Einfluss auf die Expression von TRPV4 hat, stattdessen scheint der PI3-Kinase-Signalweg eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Regulation von TRPV4 zu spielen (Sell, 2014). Hier sind weitere Experimente notwendig, um aufzuzeigen, ob diese Expressionsregulation auch in anderen Melanomlinien vorzufinden ist und einen allgemeingültigen Mechanismus darstellt.

Neben TRPC- und TRPV-Kanälen ist auch eine Expression und progressionsfördernde Rolle weiterer TRP-Kanäle aus den anderen Unterfamilien im Melanom denkbar. Es ist zum Beispiel bekannt, dass die vier Mitglieder der TRPM-Unterfamilie TRPM1, TRPM2, TRPM7 und TRPM8 für die Regulation der Physiologie gesunder und maligner Melanozyten von Bedeutung sind (Guo et al., 2012). TRPM2 wirkt als Redoxsensor und kann Apoptose und Nekrose in Melanomzellen induzieren (Orfanelli et al., 2008). TRPM7 verfügt über entgiftende Eigenschaften und verhindert die Akkumulation cytotoxischer Nebenprodukte der Melaninsynthese (McNeill et al., 2007). Für TRPM1 wurde eine inverse Korrelation der TRPM1-Expression mit der Tumprogression und

auch mit der Prognose für die Melanompatienten festgestellt. Dabei wird vermutet, dass TRPM1 als Tumorsuppressor im Melanom fungiert, da man bei Melanomen im Frühstadium eine starke TRPM1-Expression fand, während TRPM1 in metastasierten Melanomen nur sehr gering exprimiert war beziehungsweise gar nicht detektiert werden konnte (Duncan et al., 1998; Fang und Setaluri, 2000; Duncan et al., 2001). TRPM8 hingegen zeigte eine hohe Expression in humanen Melanomzellen und es wird vermutet, dass TRPM8 Einfluss auf den Ca^{2+} -Haushalt hat und darüber auf das Zellüberleben. Eine Aktivierung mit dem TRPM8-Agonisten Menthol führte zu anhaltendem Ca^{2+} -Einstrom in Melanomzellen und verringerte die Zellvitalität (Yamamura et al., 2008). Dies konnte kürzlich in A375 bestätigt werden, auch hier führt die Aktivierung von TRPM8 durch Menthol zu einer dosisabhängigen Senkung der Zellvitalität. Gleiche Versuche mit HeLa-Zellen, die TRPM8 nicht exprimieren, hatten keinen cytotoxischen Effekt (Kijpornyongpan et al., 2014). Somit können durchaus auch Vertreter der TRPM- oder anderer TRP-Unterfamilien in den hier untersuchten Melanomlinien auftreten. Weitere Experimente dieser Arbeit fokussierten sich auf TRPV4, da dieser Kanal bei der Untersuchung der Unterfamilien TRPC und TRPV als interessantester Kandidat hervorgegangen war.

4.2 Einfluss von TRPV4 auf die Proliferation und Migration von Melanomzellen

Wie im letzten Abschnitt beschrieben, konnte mittels Calcium-Imaging eine funktionelle Expression von TRPV4 in allen drei untersuchten Melanomlinien festgestellt werden. Eine solche Expression eines Kanals in malignen Zellen könnte auf veränderte transkriptionelle Kontrolle oder eine generelle Deregulation in Tumorzellen zurückführbar sein, ohne dabei in einem kausalen Zusammenhang zur onkogenen Entwicklung der Zellen zu stehen. Es ist aber auch möglich, dass die Aktivität des Kanals einen Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase der Zellen hat, der den Zellen einen Vorteil verschafft und letztlich ihre Malignität erhöht. In diesem Falle wäre es denkbar, dass Inhibitoren des Kanals ein therapeutisches Potential haben. Um erste Hinweise auf eine mögliche Bedeutung von TRPV4-Kanälen auf die Eigenschaften der untersuchten Melanomzellen zu erhalten, wurden *in vitro*-Tests zur Zellproliferation und zur Migration der Zellen in Gegenwart eines Kanalinhibitors durchgeführt.

Die MTT-Proliferations-Assays zeigten sehr deutlich, dass durch Hemmung von TRPV4 mittels HC-067047 die Proliferation in den zwei untersuchten Melanomlinien Mel Im und A375 um bis zu 50% reduziert wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass die verringerte Proliferation nicht auf einen cytotoxischen Effekt von HC-067047, sondern sehr wahrscheinlich auf eine Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms über TRPV4 zurückzuführen ist. Mithilfe von Transwell- und *wound healing*-Assays konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass durch eine Inhibition von TRPV4 mittels

HC-067047 auch die Migration dosisabhängig gehemmt wird. Diese Beobachtungen legen nahe, dass TRPV4 eine Schlüsselfunktion bei der intrazellulären Regulation von Melanomzellen einnimmt. Eine bedeutende Rolle von TRPV4-Kanälen für die Zellmigration von Krebszellen wurde bereits für andere Tumorentitäten vermutet. Fiorio Pla und Kollegen hatten in einer Studie mit humanen Mammakarzinom-Endothelzellen ebenfalls festgestellt, dass die Aktivität des Kanals einen wichtigen Einfluss auf die Migration dieser Zellen hat (Fiorio Pla et al., 2012). Im Vergleich zu gesunden Endothelzellen war die TRPV4-Expression in den endothelialen Mammakarzinom-Zellen signifikant erhöht und die malignen Zellen wiesen außerdem einen stärkeren, durch Arachidonsäure oder 4 α -PDD induzierten Ca²⁺-Einstrom auf. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von TRPV4 durch Arachidonsäure zum Umbau des Aktin-Netzwerkes und einer gesteigerten Translokation von TRPV4 zur Zellmembran führt und dies schließlich in einem höheren Ca²⁺-Einstrom und einer gesteigerten Migration der Mammakarzinom-Zellen resultiert. Eine erhöhte Expression von TRPV4 konnte zudem auch in renalen Endothelzellen nachgewiesen werden. Daher wird vermutet, dass TRPV4 eine entscheidende Rolle für die Regulation der Migration in malignen Endothelzellen spielt und schließlich auch die Angiogenese und das Tumorwachstum fördert (Fiorio Pla et al., 2012).

Trotz der verschiedenen Hinweise auf eine Bedeutung von TRPV4 für zelluläre Eigenschaften gibt es bisher keine belegbare Hypothese für die molekularen Mechanismen, durch die TRPV4 beziehungsweise ein vom Kanal ermöglichter, höherer Ca²⁺-Einstrom eine Tumorzelle beeinflussen kann. Viele Wissenschaftler gehen aber davon aus, dass Ca²⁺-abhängige Veränderungen der zellulären Transkription hierbei bedeutsam sein könnten. Bei Zellen der glatten Muskulatur der Lunge hatten Zhao und Kollegen beobachtet, dass der Ca²⁺-Einstrom über TRPV4 zur Aktivierung von Calcineurin führt (Zhao et al., 2014). Calcineurin ist eine Phosphatase, die den Transkriptionsfaktor *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) dephosphorylieren kann und damit seine Aufnahme in den Zellkern ermöglicht. Zhao et al. beschrieben diesen Mechanismus als die molekulare Grundlage einer durch TRPV4 stimulierten Zellproliferation (Zhao et al., 2014). Erste Versuche in der eigenen Arbeitsgruppe konnten auch für die Melanomlinien Mel Im und A375 einen ähnlichen Mechanismus bestätigen. Hier führten zwei getestete TRPV4-Agonisten (4 α -PDD und GSK1016790A) jeweils zu einer erhöhten COX2-Expression (R. Schönherr und B. Malik, unveröffentlicht). COX2-Expression unterliegt dem Calcineurin/NFAT-Signalweg, der auch in Melanomzellen bereits nachgewiesen wurde (Flockhart et al., 2009). Damit könnte der Ca²⁺-Einstrom über TRPV4 und eine damit verbundene Stimulation des Calcineurin/NFAT-Signalweges eine wichtige Bedeutung für die Proliferation von Melanomzellen haben. Während die Rolle des Transkriptionsfaktors NFAT in Immunzellen seit langem bekannt

und gut untersucht ist, wird eine Bedeutung des NFAT-Signalweges für die Tumorprogression erst seit wenigen Jahren diskutiert (Mancini und Toker, 2009).

Zur Inhibition der Proliferation und der Migration waren bis zu zehnfach höhere Konzentrationen des Inhibitors HC-067047 erforderlich als zur vollständigen Hemmung des TRPV-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms notwendig waren. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen könnte zum einen das Kulturmedium sein, welches bei den funktionellen Assays eingesetzt wurde. Während die Pufferlösung für Calcium-Imaging-Experimente eine definierte Zusammensetzung besitzt, könnten Komponenten im Kulturmedium wie zum Beispiel Proteine an den Inhibitor binden und damit die effektive Inhibitorkonzentration herabsetzen. Um Zellfunktionen beeinflussen zu können, erfordert es zudem einen Block von mehr als 90% der Kanäle und damit eine deutlich höhere Konzentration des Inhibitors. Ferner stellt die Methode des Ca^{2+} -Imagings einen direkten Readout des Hemmeffekts auf den Ca^{2+} -Kanal dar. In funktionellen Assays sind jedoch meist mehrere Signalwege involviert und tragen zum Endergebnis bei.

4.3 Einfluss von KCa3.1 auf Ca^{2+} -Homöostase im Melanom

4.3.1 Expression von KCa3.1 in Melanomlinien

In vielen Krebsarten konnte eine veränderte Expression von K^{+} -Kanälen nachgewiesen werden. In den meisten Fällen handelt es sich um eine Überexpression des jeweiligen Kanals, aber auch eine veränderte Aktivität oder subzelluläre Lokalisation können die nachgeschalteten Signalwege beeinflussen. K^{+} -Kanäle können in experimentellen Systemen die Proliferation, Migration und Invasion von Tumorzellen unterstützen. Geht man davon aus, dass diese zentralen Eigenschaften von Tumorzellen auch in der realen Krankheitssituation im Menschen durch K^{+} -Kanäle gefördert werden, so ergeben sich daraus völlig neue therapeutische Optionen. Mögliche klinische Studien setzen aber zunächst eine sehr fundierte Kenntnis der in Frage kommenden Kanaltypen und ihrer Rolle in bestimmten Krebsformen voraus. Bisher konnten Vertreter aus allen drei großen Kaliumkanal-Familien in Tumorzellen identifiziert werden (Ouadid-Ahidouch und Ahidouch, 2013; Huang und Jan, 2014). Eine besonders auffällige Rolle spielt dabei der spannungsaktivierte Kv10.1-Kanal (KCNH1, EAG1), welcher in mehr als 70% aller humanen Tumoren verschiedener Organe nachgewiesen werden konnte (Hemmerlein et al., 2006). Da die Expression dieses Kanals im gesunden Organismus weitgehend auf das Gehirn beschränkt ist, wird er als vielversprechender Tumormarker angesehen (Rodriguez-Rasgado et al., 2012). Interessanterweise ist dieser Kanal aber im Melanom eher seltener nachweisbar. Eine immunhistochemische Studie fand Kv10.1-Protein in 22 von 59 untersuchten Melanomproben (Hemmerlein et al., 2006). Funktionell wurde ein Kv10.1-vermittelter Strom durch die eigene Arbeitsgruppe in verschiedenen Melanomzellen nachgewiesen

(Meyer et al., 1999). Bei elektrophysiologischen Untersuchungen an mehreren Melanomlinien und primären Melanomzellkulturen konnte aber in mehr als 50% der Proben kein typischer Kv10.1-Strom gefunden werden (Schönherr, unveröffentlicht).

In weiteren molekularbiologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigte sich stattdessen, dass der Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanal KCa3.1 in primären Kulturen humaner Melanommetastasen und in etablierten Melanomlinien häufig nachweisbar ist. Die Expression von KCa3.1 war etwa fünffach erhöht gegenüber Melanozyten aus der Vorhaut gesunder Patienten (Buttstädt et al., unveröffentlicht). Damit ist dieser Kanal ein interessanter Kandidat zur pharmakologischen Beeinflussung von Melanomzellen und für Grundlagenuntersuchungen zum Einfluss von K^{+} -Kanälen auf Melanomzellen. Da der KCa3.1-Kanal durch freies Ca^{2+} aktiviert wird und dafür bekannt ist, dass er den Ca^{2+} -Einstrom in T-Zellen, Makrophagen sowie Prostatakrebs- und Glioblastomzellen beeinflussen kann (Chandy et al., 2004; Lallet-Daher et al., 2009; Gao et al., 2010; Catacuzzeno et al., 2012), wäre es denkbar, dass ein ähnlicher Mechanismus auch in Melanomzellen von Bedeutung ist. Um umfassende Untersuchungen an Melanomzellen zu ermöglichen, sollten weitere Melanomlinien, die im Mittelpunkt von Untersuchungen innerhalb des Forscherverbundes „*Melanoma Research Network*“ (Deutsche Krebshilfe) standen, auf das Vorhandensein von KCa3.1 überprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte mithilfe elektrophysiologischer Untersuchungen in den humanen Melanomlinien Mel Im, A375 und Ma-Mel-86a aus dem Forscherverbund ein Ca^{2+} -abhängiger K^{+} -Auswärtsstrom beobachtet werden, der zudem mit dem spezifischen KCa3.1-Blocker TRAM-34 inhibiert werden konnte. Neben dem Nachweis einer funktionellen Expression von KCa3.1, konnte dies auch auf Transkriptionsebene bestätigt werden. Nur in den Zellen der humanen Melanomlinie SK-Mel 28 konnte weder KCa3.1-mRNA noch KCa3.1-Strom nachgewiesen werden. Dies widerspricht Resultaten anderer Arbeiten, wo eine Expression von KCa3.1 und auch eine Reduktion der Migration durch KCa3.1-Block festgestellt werden konnten (Schwab et al., 1999). Jedoch sind Tumorzellen sehr heterogen und verschiedene Chargen einer Zelllinie oder aus anderen Laboren können sich durchaus unterscheiden (Eberle et al., 2010; Allison und Sledge, 2014). Ein Vorhandensein von KCa3.1 konnte mit diesen Methoden in der von der Arbeitsgruppe schon vorher untersuchten humanen Melanomlinie IGR1 (Meyer et al., 1999) nochmals bestätigt werden. Interessanterweise zeigte sich zudem ein Zusammenhang zwischen der mRNA-Menge und dem gemessenen KCa3.1-Ausstrom. Je größer der bestimmte mRNA-Gehalt, desto größer war auch die gemessene Stromdichte in den entsprechenden Melanomlinien. Diese Korrelation konnte auf bereits erhobene Daten aus primären Tumoren und Metastasen ausgedehnt werden (S. Haun, K. Schönherr). In Kontroll-Melanozyten (isoliert aus der Vorhaut gesunder

Patienten) war dagegen weder mRNA noch KCa3.1-Strom nachgewiesen worden. Man kann also davon ausgehen, dass die Expression des Kanals überwiegend auf der Ebene der Transkription reguliert ist. Tatsächlich fand N. Buttstädt (unveröffentlicht), dass in Melanomzellen (A375, IGR1) besonders eine konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalwegs zu erhöhter Transkription von KCa3.1 führt. Eine erhöhte Expression von KCa3.1 in den untersuchten Melanomlinien lässt vermuten, dass dieser K^+ -Kanal einen pathologischen Beitrag zum Melanom leisten könnte. In einigen Linien waren neben KCa3.1 weitere Ströme erkennbar, die eine Spannungsabhängigkeit zeigten, aber nicht weiter charakterisiert wurden. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass auch sie einen Einfluss auf pathogene Prozesse im Melanom haben.

Die Auswertung der Stromdaten erfolgte in einem Spannungsbereich, in dem spannungsabhängige K^+ -Kanäle weniger Einfluss auf die Stromamplitude haben. Dieser Spannungsbereich, von -40 mV bis -25 mV, wurde zudem gewählt, da er in etwa dem physiologischen Bereich entspricht, der in Tumorzellen anzutreffen ist (Yang und Brackenbury, 2013). Eine Aktivität in diesem Spannungsbereich unterstützt die Vermutung, dass KCa3.1 einen Einfluss auf physiologische Prozesse wie Proliferation oder Sekretion in Melanomzellen haben könnte.

4.3.2 Der Einfluss von KCa3.1 auf die Zellmigration, Proteinsekretion und Zellproliferation

Die Fähigkeit zur Migration ist eine wichtige Grundvoraussetzung von Tumorzellen, um sich vom primären Tumor lösen zu können und in das Lymphsystem oder in den Blutkreislauf sowie nachfolgend in andere Gewebe einzudringen (Brooks et al., 2010; Hanahan und Weinberg, 2011). Die Dissemination von Tumorzellen führt schließlich zur Bildung von Metastasen, was die Heilungschancen der Patienten dramatisch senkt und ein Hauptmerkmal aggressiver Tumoren ist.

Mit dem KCa3.1-spezifischen Blocker TRAM-34 konnte in *wound healing*-Assays die Migration von Mel Im-Zellen dosisabhängig reduziert werden (N. Buttstädt, unveröffentlicht). Dass K^+ -Kanäle die Migration humaner Melanomzellen beeinflussen können, hatten bereits Experimente von Schwab et al. gezeigt. In ihren Versuchen konnte mit Charybdotoxin die Migration der Melanomzellen vermindert werden (Schwab et al., 1999). Charybdotoxin ist ein Skorpiontoxin, welches sowohl KCa3.1- als auch KCa1.1- und Kv1.3-Kanäle inhibiert (Ishii et al., 1997). Dass KCa3.1-Kanäle für die Migration von Bedeutung sind, konnte auch schon in anderen humanen Zellen und Zelllinien beobachtet werden, so auch für die chemotaktische Bewegung von Fibrozyten (Cruse et al., 2011), Mastzellen der Lunge (Cruse et al., 2006), aktivierten T-Zellen (Kuras et al., 2012) und Glioblastomzellen (Sciacaluga et al., 2010; Catacuzzeno et al., 2011). Dabei sind die molekularen Mechanismen, die der Migrationsförderung zugrunde liegen, meist weniger gut bekannt. Es wird aber angenommen, dass K^+ -Kanäle durch Volumenregulation

(Hoffmann und Dunham, 1995) oder durch Regulation des Ca^{2+} -Einstroms die Zellmigration beeinflussen können (Schwab et al., 2012).

Durch Zusammenarbeit mit Forschern der Universität Regensburg konnte nun für Melanomzellen ein weiterer Mechanismus aufgeklärt werden, durch den das Migrationsverhalten der Zellen beeinflusst werden kann. Die eigenen Messungen an den beiden Linien Mel Im und Mel Ju hatten bestätigt, dass in beiden Linien ein KCa3.1-vermittelter K^+ -Strom auftritt. Eine Hemmung dieses KCa3.1-Stroms mittels TRAM-34 oder durch Transfektion dominant-negativer KCa3.1-Mutanten reduzierte die Sekretion des MIA-Proteins (*melanoma inhibitory activity*) in den beiden Melanomlinien (Schmidt et al., 2010). Frühere Studien derselben Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass die MIA-Sekretion einen fördernden Einfluss auf die Migration dieser Zellen hat. Die Sekretion von MIA erfolgt bevorzugt am hinteren Zellende und fördert das Ablösen der Melanomzellen von Komponenten der extrazellulären Matrix und so die Migration von Melanomzellen, und begünstigt schließlich auch die Bildung von Metastasen (Bosserhoff et al., 2003). Für den KCa3.1-Kanal wurde bereits früher ein bevorzugter Einbau am hinteren Zellende von polarisierten, migrierenden Zellen nachgewiesen (Schwab et al., 1995).

Unsere Analysen ergaben, dass die Sekretion des MIA-Proteins durch Hemmung der KCa3.1-Aktivität herabgesetzt wird. Im Gegenzug konnte die Freisetzung von MIA durch Applikation des KCa3.1-Aktivators 1-EBIO gesteigert werden. Bei heterologer Expression von MIA in HEK 293-Zellen, welche natürlicherweise kein MIA-Protein sekretieren, bewirkte die gleichzeitige Expression von KCa3.1 eine gesteigerte Ausschüttung von MIA im Vergleich zu HEK 293, welche allein mit dem MIA-Plasmid transfiziert worden waren. Sehr wahrscheinlich lässt sich der Einfluss von KCa3.1 auf die MIA-Sekretion auf eine lokale Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration zurückführen. Wenn die untersuchten Melanomlinien mit dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM behandelt wurden, konnte eine Reduktion der MIA-Sekretion und auch der Migration beobachtet werden, die sich durch Zugabe von TRAM-34 und 1-EBIO nicht mehr modulieren ließ (Schmidt et al., 2010).

MIA wird in primären und metastatischen Tumoren, aber nicht in gesunden Hautzellen und Melanozyten exprimiert (Bosserhoff et al., 1996; Bosserhoff et al., 1999). Die Expression von MIA ist ein bedeutender Indikator für die Aggressivität und Progressivität melanozytärer Tumore (Bosserhoff et al., 1999; Poser et al., 2004). Zusammenfassend kann man sagen, dass die MIA-Sekretion durch die Aktivität des KCa3.1-Kanals signifikant erhöht wird und somit die Migration und das invasive Potential von Melanomzellen fördert. Die Ergebnisse des *wound healing*-Assays mit Mel Im-Zellen und der MIA-Sekretion lassen vermuten, dass die verringerte Migration in Gegenwart von TRAM-34 sehr wahrscheinlich auf eine durch den Block der

KCa3.1-Aktivität hervorgerufene, verminderte Sekretion des MIA-Proteins zurückzuführen ist. Dieses Modell müsste für weitere Melanomlinien überprüft werden. Daraus kann man schließen, dass KCa3.1 für die Migrationseigenschaften von Melanomzellen eine wichtige Rolle spielt und damit einen möglichen Angriffspunkt in der Melanomtherapie darstellt.

Ein typisches Kennzeichen vieler Krebszellen ist eine erhöhte Proliferation im Vergleich zu nichttransformierten Zellen (Hanahan und Weinberg, 2011). Eine Beeinflussung der Zellproliferation durch K^+ -Kanäle war eine der ersten Funktionen solcher Kanäle, die man außerhalb des Nervensystems entdeckte. Man hatte beobachtet, dass ein breites Spektrum von K^+ -Kanalblockern hemmend auf die Zellproliferation wirkt (DeCoursey et al., 1984). Während des Zellzyklus kommt es zur Änderung der Expression oder auch der Aktivität verschiedener K^+ -Kanäle (Takahashi et al., 1993; Arcangeli et al., 1995; Pardo et al., 1998) und damit ändert sich die Permeabilität der Zellmembran für Kaliumionen und folglich auch das Membranpotential. So kommt es durch eine erhöhte K^+ -Permeabilität an der Grenze von G1- und S-Phase sowie während des G2/M-Übergangs zur Hyperpolarisation der Membran. Während des G0/G1-Übergangs sinkt die K^+ -Permeabilität und das Membranpotential nimmt depolarisierte Werte an. Für den Fortschritt des Zellzyklus sind die oszillierenden Änderungen des Membranpotentials entscheidend (Blackiston et al., 2009). Im Vergleich zu den von Neuronen abgefeuerten Aktionspotentialen sind diese Änderungen jedoch langsam, graduell und kleiner, da hier nur die Leitfähigkeit, die das Ruhepotential bestimmt, modifiziert wird (Sachs et al., 1974; Boonstra et al., 1981; Wonderlin et al., 1995; Urrego et al., 2014).

Es ist bereits bekannt, dass der KCa3.1-Kanal die Zellproliferation regulieren kann. So ist dieser Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanal an der Proliferation von mesenchymalen Stammzellen der Ratte und vaskulären Zellen der glatten Muskulatur beteiligt (Wang et al., 2008; Bi et al., 2013). Ein Einfluss von KCa3.1 auf die Proliferation von Krebszellen konnte bereits in Leberkarzinomzellen, Endometrium-, Brustkrebs- und Prostatakrebszellen beobachtet werden (Ouadid-Ahidouch et al., 2004; Wang et al., 2007; Lallet-Daher et al., 2009; Faouzi et al., 2010; Yang et al., 2013).

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, hatte der KCa3.1-Block mittels TRAM-34 ebenfalls zur Reduktion der Proliferation von A375-Melanomzellen geführt (Mitteilung von N. Buttstädt). Darüber hinaus zeigten spätere Untersuchungen an Maus-Melanomzellen in Zusammenarbeit mit Forschern der Universität Würzburg im Rahmen des „*Melanoma Research Network*“, dass auch *in vivo* Proliferationseffekte auftreten. In der murinen Melanomzelllinie Nu2 konnten sowohl KCa3.1-mRNA als auch typische KCa3.1-vermittelte K^+ -Ströme nachgewiesen werden (eigene Ergebnisse, nicht gezeigt). Bei diesen Zellen führte ein Block von KCa3.1 mit TRAM-34 zu einer dosisabhängigen Reduktion der Proliferation in der Zellkultur (C. Adam, Universität Würzburg).

Tumoren, die durch subkutane Injektion dieser Zellen in immungeschwächten Mäusen erzeugt wurden, waren verkleinert, wenn gleichzeitig TRAM-34 intraperitoneal gespritzt wurde.

In einer weiteren murinen Melanomlinie (LZ8A-1) konnte hingegen kein KCa3.1-Transkript und auch kein Strom nachgewiesen werden. Bei diesen Zellen konnte zudem weder *in vitro* noch *in vivo* eine Abnahme der Proliferation durch TRAM-34 beobachtet werden (Buttstädt et al., 2011). In elektrophysiologischen Untersuchungen an der Linie LZ8A-1 konnte ein K^+ -Strom nachgewiesen werden, der Eigenschaften des KCa1.1-Kanals aufwies (eigene Ergebnisse, nicht gezeigt). Möglicherweise übernimmt KCa1.1 in dieser Linie die proliferationsfördernde Eigenschaften, die KCa3.1 in anderen Melanomlinien hat. Eine solche Proliferationsförderung durch KCa1.1 wurde auch für LNCaP-Zellen, eine Prostatakrebs-Zelllinie, beschrieben. Hier führt ein Komplex aus KCa1.1 mit einem spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal zu konstitutivem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle und verstärkter Proliferation der LNCaP-Zellen (Gackiere et al., 2013).

Während es also viele Hinweise auf eine proliferationsfördernde Wirkung von KCa3.1 in Melanomzellen und anderen Tumorzellen gibt, sind die zugrunde liegenden Wirkmechanismen nicht sicher geklärt. Es besteht die allgemeine Annahme, dass der Einfluss der K^+ -Kanäle auf die Proliferation zumindest teilweise über Ca^{2+} -abhängige Signalwege vermittelt wird. Es wird vermutet, dass KCa3.1 durch Hyperpolarisation der Membran den Einstrom von Ca^{2+} verstärkt, was wiederum verschiedene Ca^{2+} -abhängige Enzyme aktiviert, die die Expression oder Aktivität von Transkriptionsfaktoren regulieren (Chandy et al., 2004). Eine weitere Möglichkeit zur Kontrolle der Proliferation ist die Regulation des Zellvolumens durch den KCa3.1-Strom (Tao et al., 2008). Eine Regulation der Proliferation durch KCa3.1 unabhängig von der K^+ -Leitfähigkeit wird auch diskutiert (Millership et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanal KCa3.1 einen wichtigen Beitrag zur Proliferation und Migration von Melanomzellen leistet und aufgrund der stark verbreiteten Expression in Primärtumoren und Metastasen schließlich auch als Marker für das maligne Melanom in Frage kommt.

4.3.3 KCa3.1 Einfluss auf Ca^{2+} -Einstrom

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass KCa3.1 in vier von fünf untersuchten Melanomlinien funktionell exprimiert wird. Die Inhibition des KCa3.1-Kanals mit TRAM-34 führte zur Reduktion von Migration und Proliferation der Melanomzellen. Zudem hatten Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Forschern der Universität Regensburg ergeben, dass die MIA-Sekretion durch die Aktivität des KCa3.1-Kanals gefördert wird (Schmidt et al., 2010). Dies spricht für eine wichtige Rolle von KCa3.1 für die Aufrechterhaltung überlebensfördernder

Funktionen von Melanomzellen. Ein allgemein anerkannter Mechanismus, wie Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle zelluläre Prozesse beeinflussen können, ist die Regulation der Ca^{2+} -Homöostase durch Beeinflussung des Membranpotentials (Kunzelmann, 2005). Ca^{2+} -Einstrom führt lokal zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und es kommt zur Depolarisation der Membran, was einen weiteren Einstrom von Ca^{2+} limitiert. Durch den Ca^{2+} -Anstieg werden aber gleichzeitig auch Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle geöffnet. Durch Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen kommt es zur Hyperpolarisation der Zellmembran und Erhöhung des elektrochemischen Gradienten für den Ca^{2+} -Einstrom. Damit ermöglichen die KCa-Kanäle einen anhaltenden Ca^{2+} -Einstrom und erhöhte, intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen, die unter anderem essentiell sind für die Zellzyklusprogression (Berridge et al., 2003). Dass Ca^{2+} -Kanäle und Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle eine funktionelle Einheit bilden, konnte schon in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden und scheint sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch von Bedeutung zu sein (Gueguinou et al., 2014).

Die Messungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von ruhenden Melanomzellen haben ergeben, dass diese im Vergleich zu nicht-melanozytären HEK 293-Zellen deutlich erhöhte Ca^{2+} -Level aufweisen. Weiterhin führte die Applikation von TRAM-34 in Mel Im-Zellen zur Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und eine Überexpression von KCa3.1 in HEK 293-Zellen zu erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen. Dies lässt vermuten, dass KCa3.1 bereits in ruhenden Melanomzellen die Ca^{2+} -Homöostase beeinflusst. Damit ist eine gesteigerte Proliferation oder Migration unabhängig von äußeren Stimuli wie Wachstumsfaktoren denkbar - ein wichtiges Merkmal von Krebszellen (Hanahan und Weinberg, 2011).

Dass Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle eine gewisse „Ruheaktivität“ aufweisen, hatten Schwab et al. bereits bei humanen Melanomzellen der Linie A7 beobachten können (Schwab et al., 1999). Charybdotoxin, ein KCa3.1- und KCa1.1 -Blocker, führte in diesen Studien zu einer verminderten Migration der humanen Melanomzellen in Verbindung mit einer gesteigerten Polymerisation von F-Aktin. Als mögliche Erklärung dafür gaben Schwab und Kollegen an, dass der Block Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle zu einer Depolarisation der Membran führt und somit den Ca^{2+} -Einstrom vermindert (Schwab et al., 1999). Geringe Ca^{2+} -Konzentrationen begünstigen die Polymerisation von F-Aktin, während hohe Ca^{2+} -Konzentrationen die Depolymerisation von F-Aktin fördern (Oertner und Matus, 2005; Dushek et al., 2008). Die Regulation der Polymerisation und Depolymerisation von Aktin ist entscheidend für eine koordinierte Migration der Zellen. Dies wird unterstützt durch den intrazellulären Ca^{2+} -Gradienten in polarisierten Zellen: hohe Ca^{2+} -Konzentrationen am hinteren Zellende und geringe Ca^{2+} -Konzentrationen in vorderen Zellausstülpungen (Brundage et al., 1991).

KCa3.1 scheint für die Zellmigration eine wichtige Rolle zu spielen. Dafür spricht außerdem, dass KCa3.1 am hinteren Zellende aktiv ist (Schwab et al., 1995), in Melanomzellen für erhöhtes Ca^{2+} sorgt und die Ca^{2+} -abhängige Sekretion von MIA am hinteren Zellende begünstigt (Schmidt et al., 2010). Zudem hatten Chantome und Kollegen ähnliche Beobachtungen mit einem weiteren Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanal gemacht. Ihre Arbeiten zeigten eine Expression von KCa2.3 in Melanomzellen, jedoch nicht in Melanozyten. Die KCa2.3-Expression war verbunden mit einer Hyperpolarisation der Zellmembran und verstärkter Migration sowie Invasion der Zellen (Chantome et al., 2009). Somit könnte dieser Mechanismus eine breitere Bedeutung in Melanomzellen haben, auch wenn verschiedene Vertreter der Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanal-Familie diese Funktion übernehmen. KCa2.x- und KCa3.1-Kanäle verfügen über eine ähnliche Ca^{2+} -Affinität (Gutman et al., 2005). Im Gegensatz zu KCa1.1, der erst bei höheren Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert, können eine Aktivierung von KCa2.x- oder KCa3.1-Kanälen und die damit verbundene Hyperpolarisation der Zellmembran bereits bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen erfolgen.

Auch wenn die hier beschriebene Hypothese zur Wirkung von KCa3.1 auf die Ca^{2+} -Homöostase durch zahlreiche Beobachtungen unterstützt wird, trifft sie nicht auf alle Melanomzellen zu. So konnte beispielsweise in der Melanomlinie A375 durch TRAM-34 keine Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt werden. Möglicherweise wirken die in den A375-Zellen gemessenen starken Cl^- -Ströme, die ebenso wie der KCa3.1-Strom Ca^{2+} -abhängig waren, der KCa3.1-vermittelten Hyperpolarisation entgegen und beeinträchtigen so ihrerseits die Zellmigration unabhängig von der Verfügbarkeit der KCa3.1-Kanäle.

Neben der Untersuchung zum Einfluss von KCa3.1 auf das Ca^{2+} -Level in ruhenden Zellen, wurde auch überprüft, ob ein Einfluss auf induzierte Ca^{2+} -Einstrome auftritt. Als mögliche Ca^{2+} -Kanäle in den untersuchten Melanomlinien wurden im Rahmen dieser Arbeit CRAC-Kanäle und der TRPV4-Kanal in den Melanomlinien identifiziert. Zur Überprüfung, ob der Ca^{2+} -Einstrom über diese Ca^{2+} -Kanäle durch KCa3.1 beeinflusst werden kann, wurden die jeweiligen Ca^{2+} -Einstromwege aktiviert und gleichzeitig der KCa3.1-spezifische Blocker TRAM-34 eingesetzt.

Zur Aktivierung der CRAC-Kanäle wurde Thapsigargin (TG) verwendet, was zum Entleeren der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher und Öffnen der CRAC-Kanäle führt. Die gleichzeitige Applikation von TRAM-34 hatte keinen Einfluss auf die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER, konnte aber den Ca^{2+} -Einstrom über CRAC-Kanäle signifikant verringern. Ähnliche Beobachtungen hatten auch Lallet-Daher sowie Gao und Kollegen in LNCaP-Zellen beziehungsweise in humanen Makrophagen gemacht. Auch hier hatte der Block von KCa3.1 keinen Einfluss auf die Entleerung

intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher, während die beiden KCa3.1-Blocker TRAM-34 und Charybdotoxin den *store-operated Ca^{2+} entry* (SOCE) deutlich reduzierten (Lallet-Daher et al., 2009; Gao et al., 2010). Unspezifische Wirkungen eines Blockers sind jedoch nie restlos auszuschließen. Es war in diesem Zusammenhang aber interessant, dass nicht nur Hemmung von KCa3.1 einen Einfluss auf den zellulären Ca^{2+} -Einstrom hatte, sondern dass umgekehrt auch die heterologe Expression des Kanals eine Wirkung hatte. Nach Transfektion von HEK 293-Zellen mit KCa3.1 war der endogene *store-operated Ca^{2+} entry* (SOCE) signifikant erhöht, was zeigt, dass KCa3.1 grundsätzlich SOCE-Ströme fördern kann.

Auch der Ca^{2+} -Einstrom über TRPV4 in Melanomzellen wurde durch KCa3.1 beeinflusst. Ein durch den TRPV4-Aktivator 4α -PDD ausgelöster Ca^{2+} -Einstrom wurde durch den Inhibitor TRAM-34 signifikant reduziert. Man kann also davon ausgehen, dass es in solchen Melanomzellen, die beide Kanäle exprimieren, zu einer wechselseitigen, positiven Beeinflussung und zu stärkeren Effekten auf zelluläre Funktionen wie Migration und Proliferation kommen kann. Eine solche Wirkung von Ionenkanälen über eine Modulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration schließt natürlich nicht aus, dass auch weitere molekulare Mechanismen wirken können. So konnten Millership et al. zeigen, dass die erhöhte Proliferation nicht durch den KCa3.1-Strom und einer damit verbundenen Erhöhung des SOCE-Stroms bewirkt wird, sondern vermutlich auf eine direkte Interaktion von KCa3.1 mit den MAPK- und JNK-Signalwegen zustande kommt (Millership et al., 2011).

4.4 KCa3.1 und TRPV4 als mögliche Kandidaten in der Melanomtherapie

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit dem KCa3.1- und TRPV4-Kanal zwei für die Melanomtherapie aussichtsreiche Zielproteine identifiziert werden. Zudem hat sich gezeigt, dass auch CRAC-Kanäle in Melanomzellen vorkommen und der Ca^{2+} -Einstrom über diese Kanäle durch KCa3.1 moduliert werden kann. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sind in Abbildung 4-1 schematisch zusammengefasst.

CRAC-Kanäle erscheinen aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens aber zunächst weniger geeignet als therapeutische Zielstrukturen. Hinzu kommt, dass für diese Kanäle bisher keine spezifischen Inhibitoren existieren, die beispielsweise für Tierversuche notwendig wären.

TRPV4 scheint ein wertvoller Kandidat für die Melanomtherapie zu sein, da ein Block dieses Kanals sowohl die Proliferation als auch die Migration der in dieser Arbeit untersuchten Melanomlinien reduziert hatte. Zudem ist der genetische Knockout von TRPV4 im Tiermodell nicht letal und die Tiere zeigten keine Verhaltensauffälligkeiten (Everaerts et al., 2010). Außerdem

existiert mit HC-067047 ein für diesen TRP-Kanal spezifischer Blocker, der bei systemischer Gabe im Tiermodell keinen Einfluss auf verschiedene lebenswichtige Parameter wie zum Beispiel Herzfrequenz, Körpertemperatur oder motorische Fähigkeiten hatte (Everaerts et al., 2010).

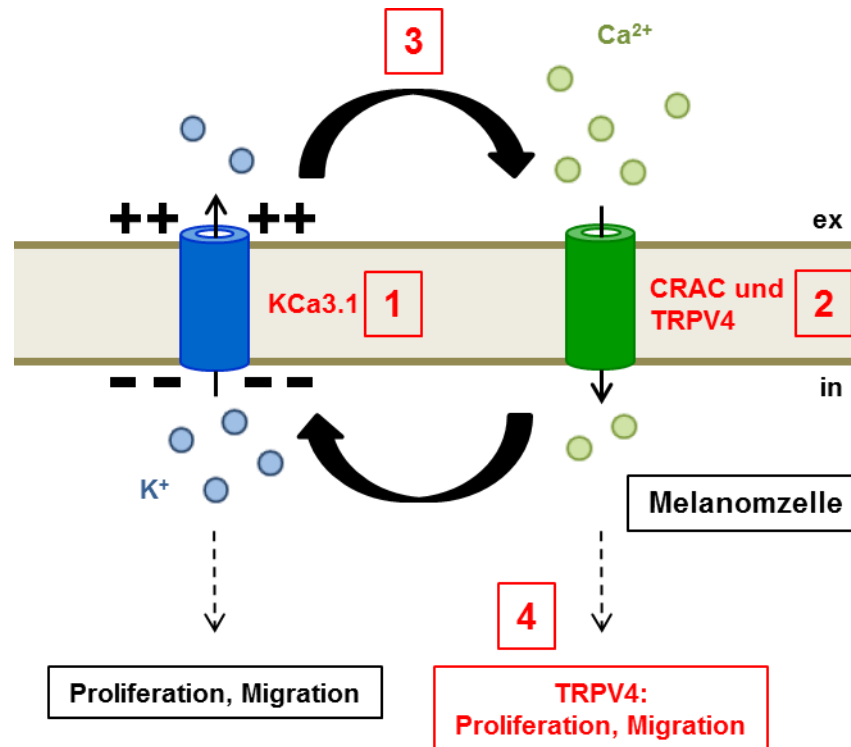


Abbildung 4-1: Überblick über zentrale Ergebnisse dieser Arbeit. Siehe auch vergleichend die Untersuchungsschwerpunkte in Abbildung 1.8. (1) Die funktionelle Expression des Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanals KCa3.1 konnte in weiteren Melanomlinien bestätigt werden. (2) Als spannungsunabhängige Ca²⁺-Kanäle konnten CRAC und der zur TRP-Familie gehörende TRPV4 in den untersuchten Melanomlinien identifiziert werden. (3) Der Ca²⁺-Einstrom über CRAC- oder TRPV4-Kanäle kann durch KCa3.1 moduliert werden. (4) TRPV4 beeinflusst die Migration und Proliferation in den untersuchten Melanomlinien. Die Membranorientierung ist angegeben als extrazellulär (ex) und intrazellulär (in).

Da funktionelle KCa3.1-Kanäle die Migration und Proliferation verschiedenster Zellen und auch Krebszellen regulieren können, liegt die Vermutung nahe, dass KCa3.1 das invasive Verhalten von Krebszellen fördert und die Bildung von Metastasen begünstigt. Tatsächlich konnte durch die KCa3.1-spezifischen Blocker TRAM-34 und Clotrimazol die Tumorbildung in einem Nacktmausmodell für Endometriumkarzinom reduziert werden (Wang et al., 2007). In einem SCID-Mausmodell, in welches humane Melanomzellen injiziert wurden, sank die Zahl an Lungenmetastasen durch die Gabe von Clotrimazol (Benzaquen et al., 1995). Ähnlich wie für TRPV4 gilt auch für KCa3.1, dass Knockout-Tiere gut lebensfähig sind, sodass auch eine systemische Behandlung mit KCa3.1-Inhibitoren prinzipiell möglich sein sollte. Während die Substanz TRAM-34 wegen geringer Wasserlöslichkeit wenig geeignet ist, ist ein anderer

KCa3.1-Blocker bereits in klinischen Studien im Zusammenhang mit der Sichelzellanämie getestet worden (Ataga et al., 2008; Ataga et al., 2011).

Bei den Untersuchungen zu KCa3.1 hatte sich gezeigt, dass die Bedeutung dieses Kaliumkanals im Melanom wahrscheinlich über die verstärkende Wirkung auf Proliferation und Migration hinausgeht. So zeigten Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Kollegen von der Charité Berlin, dass TRAM-34 allein zwar keine Apoptose in Melanomzellen auslösen kann, aber eine durch TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) induzierte Apoptose synergistisch verstärkt wird (Quast et al., 2012). TRAIL wirkt über sogenannte Todesrezeptoren und ist für die Tumorthherapie besonders interessant, da es selektiv Tumorzellen angreift, während gesunde Zellen weitestgehend unberührt bleiben (Koschny et al., 2007).

Untersuchungen in Zusammenarbeit mit E. Kunisch und R. Kinne (Universitätsklinikum Jena) haben ergeben, dass KCa3.1 auch in synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis auf ganz ähnliche Weise wirken kann. Die rheumatoide Arthritis ist eine chronisch-entzündliche Gelenkerkrankung, bei der es zu einer schmerzhaften Veränderung der Gelenke, bis hin zum Funktionsverlust durch Zerstörung der Knorpel- und Knochensubstanz kommt. Synoviale Fibroblasten sind Bestandteil der Gelenkkapsel und sie tragen durch gesteigerte Proliferation und Ausscheidung von Entzündungsmediatoren zur Bildung des krankheitstypischen, entzündlichen und hyperplastischen Pannusgewebes bei (Bartok und Firestein, 2010). In der gemeinsamen Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die Zellproliferation der synovialen Fibroblasten als auch die Sekretion von Proteinen durch diese Zellen durch den Kanal KCa3.1 gefördert wird (Friebel et al., 2014). Möglicherweise spielt darüber hinaus auch in diesen Zellen TRPV4 eine Rolle (Kochukov et al., 2006; Itoh et al., 2009), so dass die wechselseitige Wirkung von KCa3.1 und TRPV4 auch in der rheumatoiden Arthritis denkbar ist.

Somit sind KCa3.1 und TRPV4 sehr interessante Zielstrukturen für neue therapeutische Ansätze beim Melanom. Inhibitoren dieser Ionenkanäle können mit bereits zugelassenen Chemotherapeutika oder mit Inhibitoren der im Melanom aktivierten MAPK- und PI3-Kinase-Signalwege kombiniert werden. Der Effekt solcher Wirkstoff-Kombinationen auf die Migration und Proliferation von Melanomzellen *in vitro* sowie auf die Tumorprogression in Tiermodellen wird letztlich klären, ob die hier vorgestellten zellbiologischen Befunde auch von therapeutischer Relevanz sind.

5 Zusammenfassung

Die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung und Progression von Krebserkrankungen. Intrazelluläre, freie Calciumionen sind unter anderem bei der Regulation von Proliferation, Migration, Sekretion und Apoptose beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezielt nach Ionenkanälen gesucht, welche Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase in Melanomzellen haben können. Daraufhin wurden ausgewählte Melanomlinien zum einen auf eine Expression von spannungsunabhängigen Ca^{2+} -Kanälen wie *calcium release-activated calcium* (CRAC)-Kanäle und *transient receptor potential* (TRP)-Kanälen getestet. Zum anderen wurde untersucht, ob der in vorherigen Arbeiten bereits nachgewiesene K^+ -Kanal KCa3.1 den Ca^{2+} -Einstrom in Melanomzellen modulieren kann.

In dieser Arbeit konnte eine Expression der ubiquitär vorkommenden CRAC-Kanäle auch in den verwendeten Melanomlinien bestätigt werden. Sowohl mRNA für die einzelnen CRAC-Gene war mittels quantitativer PCR nachweisbar als auch die funktionelle Expression. In Calcium-Imaging-Experimenten konnte nach Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher ein Ca^{2+} -Einstrom in Melanomzellen beobachtet werden, der mit dem CRAC-Blocker 2-APB vollständig inhibiert werden konnte.

Eine Expressionsanalyse für TRP-Kanäle der Unterfamilien C und V ergab für die TRPC-Kanäle keine Hinweise auf eine ausgeprägte Expression in Melanomzellen im Vergleich zu nicht-melanozytären HEK 293-Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten zwei Gene der TRPV-Unterfamilie, *TRPV2* und *TRPV4*, eine starke Transkription in Melanomzellen. Für den TRPV2-Kanal war keine funktionelle Expression nachweisbar, für TRPV4 konnte dagegen mit dieser Arbeit erstmals eine funktionelle Expression in mehreren Melanomlinien nachgewiesen werden. Der Einsatz der beiden spezifischen TRPV4-Agonisten 4 α -PDD und GSK1016790A löste einen starken Ca^{2+} -Einstrom in allen untersuchten Melanomlinien aus, der mit dem spezifischen TRPV4-Blocker HC-067047 vollständig inhibiert werden konnte. Des Weiteren wurde beobachtet, dass eine Inhibition von TRPV4 sowohl die Migration als auch die Proliferation von Melanomlinien signifikant reduzierte, während die Zellvitalität erhalten blieb.

Eine Möglichkeit, den Ca^{2+} -Einstrom zu regulieren, besteht in der Regulation des Membranpotentials durch K^+ -Kanäle. Ein Öffnen von K^+ -Kanälen führt zu negativeren Membranpotentialen und kann so den Ca^{2+} -Einstrom verstärken. Für KCa3.1 konnte bereits in früheren Studien und Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe eine wichtige Rolle für Proliferation und Migration gezeigt werden, jedoch war noch wenig bekannt über die KCa3.1-abhängigen Mechanismen, welche die Proliferation und Migration von Melanomzellen

fördern. In dieser Arbeit war in vier von fünf untersuchten Melanomlinien ein KCa3.1-Strom elektrophysiologisch nachweisbar. Dabei korrelierte der mRNA-Gehalt mit der Stromdichte von KCa3.1.

Mit der Untersuchung des migrationsfördernden Proteins MIA konnte ein neuer Wirkmechanismus zur Regulation der Migration von Melanomzellen durch KCa3.1 aufgezeigt werden. In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Anja Bosserhoff konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl die Blockade von KCa3.1 pharmakologisch durch TRAM-34 als auch durch eine dominant-negative Mutante des KCa3.1-Kanals die Sekretion von MIA verringert werden kann. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die durch KCa3.1-vermittelte Förderung der MIA-Sekretion auf einer Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beruht.

Calcium-Imaging-Experimente zeigten schließlich, dass sowohl die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ruhender Melanomzellen als auch der Ca^{2+} -Einstrom über CRAC- und TRPV4-Kanäle durch KCa3.1 indirekt beeinflusst werden kann. Ein Block des KCa3.1-Stroms mit TRAM-34 führte zu einer signifikanten Reduktion des induzierten Ca^{2+} -Einstroms und auch der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ruhender Melanomzellen. Zudem führte die Transfektion von KCa3.1 in HEK 293-Zellen zu erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen und zur Verstärkung des induzierten Ca^{2+} -Einstroms über CRAC-Kanäle. Dies unterstützt die Hypothese, dass KCa3.1 durch Senkung des Membranpotentials die Triebkraft für den Ca^{2+} -Einstrom in Melanomlinien erhöht und somit onkogene Prozesse unterstützt.

Mit dieser Arbeit konnte für zwei Ionenkanalproteine gezeigt werden, dass sie die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase von Melanomzellen beeinflussen und onkogene Eigenschaften der Zellen fördern. KCa3.1 und TRPV4 sind damit interessante neue Kandidaten für eine therapeutische Intervention beim metastasierten Melanom. Beide Proteine sind aufgrund ihrer Membranlokalisation prinzipiell gut zugänglich für Inhibitoren und vorhandene Knockout-Mäuse, wie auch pharmakologische Studien zu anderen Krankheitsbildern deuten darauf hin, dass die zu erwartenden Nebenwirkungen einer Behandlung mit spezifischen Kanalinhibitoren vertretbar sein könnten.

Summary

Cellular Ca^{2+} homeostasis plays an important role in cancer development and progression. Intracellular free Ca^{2+} ions are involved in the regulation of proliferation, migration, secretion and apoptosis. This thesis is explicitly focused on ion channels that may have an impact on Ca^{2+} homeostasis in melanoma cells. Therefore, selected melanoma cell lines were tested for expression of non-voltage-gated Ca^{2+} channels like *calcium release-activated calcium* (CRAC) and *transient receptor potential* (TRP) channels. Furthermore, the potassium channel KCa3.1 - already known to be present in melanoma cells - was evaluated for its potential influence on cytosolic Ca^{2+} in those cells.

The study confirmed expression of CRAC channels in the three melanoma cell lines under study. mRNA of CRAC channel genes was detected through quantitative PCR. Functionality of these channels was confirmed in calcium-imaging experiments measuring Ca^{2+} influx triggered by store depletion. This Ca^{2+} influx was fully blocked by the CRAC inhibitor 2-APB.

Expression analysis for the TRP channel subfamilies C and V provided no evidence for a prominent expression of TRPC channels in melanoma cells as compared to the non-melanoma cell line HEK 293. Instead, two genes of the TRPV subfamily, *TRPV2* and *TRPV4*, showed a strong mRNA expression in melanoma cells. For TRPV2 no functional expression could be detected, but the functional expression of TRPV4 in several melanoma cell lines could be demonstrated for the first time. Application of the two selective TRPV4 agonists 4 α -PDD and GSK1016790A triggered a strong Ca^{2+} entry into all tested melanoma cell lines; Ca^{2+} entry could be blocked completely by the TRPV4 inhibitor HC-067047. Furthermore, inhibition of TRPV4 had a negative influence on migration and proliferation of melanoma cell lines but did not affect cell viability.

One possibility to regulate the Ca^{2+} entry is via an impact of K^+ channels on the membrane potential. Opening of K^+ channels leads to hyperpolarization and thus to increased Ca^{2+} entry. Former studies showed an important role for KCa3.1 in proliferation and migration, but not much was known about KCa3.1-dependent mechanisms. In this study, KCa3.1 current was detected in four of five melanoma cells, and the KCa3.1 mRNA content correlated with KCa3.1 current density.

Investigation of the migration-promoting protein MIA revealed a new mechanism for the regulation of melanoma cell migration by KCa3.1. In collaboration with the group of Anja Bosserhoff it was shown that the block of KCa3.1 by TRAM-34, as well as expression of a dominant negative channel mutant, reduced the secretion of MIA. This effect was dependent on intracellular Ca^{2+} ions.

Finally, calcium-imaging experiments showed that KCa3.1 influenced the intracellular Ca^{2+} concentrations of resting melanoma cells and Ca^{2+} entry via CRAC and TRPV4 channels. KCa3.1 current inhibition by TRAM-34 led to significant reduction of induced Ca^{2+} entry and lowered the intracellular Ca^{2+} concentration of resting melanoma cells. Furthermore, transfection of HEK 293 cells with KCa3.1 led to increased intracellular Ca^{2+} concentrations and to higher stimulated Ca^{2+} entry via CRAC channels. This supports the hypothesis that KCa3.1 increases the driving force for Ca^{2+} entry via hyperpolarization of melanoma cells, thereby promoting oncogenic processes.

Within this study, two ion channel proteins were identified that are able to influence the intracellular Ca^{2+} concentration in melanoma cells and to promote oncogenic cell functions. Therefore, KCa3.1 and TRPV4 are promising new candidates for therapeutic intervention in metastatic melanomas. Both proteins are well accessible for inhibitors due to their membrane localization. Existing knockout mice as well as clinical trials in the context of other diseases suggest that potential side effects of specific channel inhibitors are manageable.

6 Literaturverzeichnis

- Alexander, S. P., Mathie, A., Peters, J. A. (2011). Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. *Br J Pharmacol* **164** Suppl 1: S1-S24.
- Allen, D. H., Lepple-Wienhues, A., Cahalan, M. D. (1997). Ion channel phenotype of melanoma cell lines. *J Membr Biol* **155**(1): 27-34.
- Allison, K. H., Sledge, G. W., Jr. (2014). Heterogeneity and Cancer. *Oncology (Williston Park)* **28**(9).
- Arcangeli, A., Bianchi, L., Becchetti, A., Faravelli, L., Coronello, M., Mini, E., Olivotto, M., Wanke, E. (1995). A novel inward-rectifying K⁺ current with a cell-cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells. *J Physiol* **489** (Pt 2): 455-471.
- Ataga, K. I., Reid, M., Ballas, S. K., Yasin, Z., Bigelow, C., James, L. S., Smith, W. R., Galacteros, F., Kutlar, A., Hull, J. H., Stocker, J. W. (2011). Improvements in haemolysis and indicators of erythrocyte survival do not correlate with acute vaso-occlusive crises in patients with sickle cell disease: a phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study of the Gardos channel blocker senicapoc (ICA-17043). *Br J Haematol* **153**(1): 92-104.
- Ataga, K. I., Smith, W. R., De Castro, L. M., Swerdlow, P., Sauntharajah, Y., Castro, O., Vichinsky, E., Kutlar, A., Orringer, E. P., Rigdon, G. C., Stocker, J. W. (2008). Efficacy and safety of the Gardos channel blocker, senicapoc (ICA-17043), in patients with sickle cell anemia. *Blood* **111**(8): 3991-3997.
- Balch, C. M., Gershenwald, J. E., Soong, S. J., Thompson, J. F., Atkins, M. B., Byrd, D. R., Buzaid, A. C., Cochran, A. J., Coit, D. G., Ding, S., Eggermont, A. M., Flaherty, K. T., Gimotty, P. A., Kirkwood, J. M., McMasters, K. M., Mihm, M. C., Jr., Morton, D. L., Ross, M. I., Sober, A. J., Sondak, V. K. (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* **27**(36): 6199-6206.
- Bang, S., Kim, K. Y., Yoo, S., Lee, S. H., Hwang, S. W. (2007). Transient receptor potential V2 expressed in sensory neurons is activated by probenecid. *Neurosci Lett* **425**(2): 120-125.
- Barfod, E. T., Moore, A. L., Roe, M. W., Lidofsky, S. D. (2007). Ca²⁺-activated IK1 channels associate with lipid rafts upon cell swelling and mediate volume recovery. *J Biol Chem* **282**(12): 8984-8993.
- Bartok, B., Firestein, G. S. (2010). Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* **233**(1): 233-255.
- Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C. A., Sancak, Y., Bao, X. R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R. L., Kotliansky, V., Mootha, V. K. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**(7360): 341-345.
- Benzaquen, L. R., Brugnara, C., Byers, H. R., Gatton-Celli, S., Halperin, J. A. (1995). Clotrimazole inhibits cell proliferation in vitro and in vivo. *Nat Med* **1**(6): 534-540.
- Berridge, M. J. (2009). Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1793**(6): 933-940.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(7): 517-529.
- Berwick, M., Erdei, E., Hay, J. (2009). Melanoma epidemiology and public health. *Dermatol Clin* **27**(2): 205-214, viii.
- Bi, D., Toyama, K., Lemaitre, V., Takai, J., Fan, F., Jenkins, D. P., Wulff, H., Gutterman, D. D., Park, F., Miura, H. (2013). The intermediate conductance calcium-activated potassium channel KCa3.1 regulates vascular smooth muscle cell proliferation via controlling calcium-dependent signaling. *J Biol Chem* **288**(22): 15843-15853.

- Bielanska, J., Hernandez-Losa, J., Perez-Verdaguer, M., Moline, T., Somoza, R., Ramon, Y. C. S., Condom, E., Ferreres, J. C., Felipe, A.** (2009). Voltage-dependent potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 in human cancer. *Curr Cancer Drug Targets* **9**(8): 904-914.
- Blackiston, D. J., McLaughlin, K. A., Levin, M.** (2009). Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell Cycle* **8**(21): 3527-3536.
- Boonstra, J., Mummery, C. L., Tertoolen, L. G., Van Der Saag, P. T., De Laat, S. W.** (1981). Cation transport and growth regulation in neuroblastoma cells. Modulations of K⁺ transport and electrical membrane properties during the cell cycle. *J Cell Physiol* **107**(1): 75-83.
- Bootman, M. D., Collins, T. J., Mackenzie, L., Roderick, H. L., Berridge, M. J., Peppiatt, C. M.** (2002). 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP3-induced Ca²⁺ release. *FASEB J* **16**(10): 1145-1150.
- Bosserhoff, A. K., Hein, R., Bogdahn, U., Buettner, R.** (1996). Structure and promoter analysis of the gene encoding the human melanoma-inhibiting protein MIA. *J Biol Chem* **271**(1): 490-495.
- Bosserhoff, A. K., Lederer, M., Kaufmann, M., Hein, R., Stolz, W., Apfel, R., Bogdahn, U., Buettner, R.** (1999). MIA, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Anticancer Res* **19**(4A): 2691-2693.
- Bosserhoff, A. K., Moser, M., Hein, R., Landthaler, M., Buettner, R.** (1999). In situ expression patterns of melanoma-inhibiting activity (MIA) in melanomas and breast cancers. *J Pathol* **187**(4): 446-454.
- Bosserhoff, A. K., Stoll, R., Sleeman, J. P., Bataille, F., Buettner, R., Holak, T. A.** (2003). Active detachment involves inhibition of cell-matrix contacts of malignant melanoma cells by secretion of melanoma inhibitory activity. *Lab Invest* **83**(11): 1583-1594.
- Braun, A., Varga-Szabo, D., Kleinschnitz, C., Pleines, I., Bender, M., Austinat, M., Bosl, M., Stoll, G., Nieswandt, B.** (2009). Orail (CRACM1) is the platelet SOC channel and essential for pathological thrombus formation. *Blood* **113**(9): 2056-2063.
- Brini, M., Bano, D., Manni, S., Rizzuto, R., Carafoli, E.** (2000). Effects of PMCA and SERCA pump overexpression on the kinetics of cell Ca(2⁺) signalling. *EMBO J* **19**(18): 4926-4935.
- Brooks, S. A., Lomax-Browne, H. J., Carter, T. M., Kinch, C. E., Hall, D. M.** (2010). Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem* **112**(1): 3-25.
- Brundage, R. A., Fogarty, K. E., Tuft, R. A., Fay, F. S.** (1991). Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils. *Science* **254**(5032): 703-706.
- Buttstädt, N., Friebe, K., Heinemann, S. H., Schönherr, R., Adam, C., Wulff, H., Becker, J.** (2011). The intermediate-conductance Ca²⁺-activated potassium channel KCa3.1 as novel therapeutic target in malignant melanoma. 21. Deutscher Hautkrebs-Kongress 2011 und ADO-Jahrestagung, Weimar, Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft.
- Cahalan, M. D.** (2009). STIMulating store-operated Ca(2⁺) entry. *Nat Cell Biol* **11**(6): 669-677.
- Catacuzzeno, L., Aiello, F., Fioretti, B., Sforza, L., Castigli, E., Ruggieri, P., Tata, A. M., Calogero, A., Franciolini, F.** (2011). Serum-activated K and Cl currents underlay U87-MG glioblastoma cell migration. *J Cell Physiol* **226**(7): 1926-1933.
- Catacuzzeno, L., Fioretti, B., Franciolini, F.** (2012). Expression and Role of the Intermediate-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel KCa3.1 in Glioblastoma. *J Signal Transduct* **2012**: 421564.
- Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J., Julius, D.** (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* **398**(6726): 436-441.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., Julius, D.** (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**(6653): 816-824.

- Chandy, K. G., Wulff, H., Beeton, C., Pennington, M., Gutman, G. A., Cahalan, M. D.** (2004). K⁺ channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci* **25**(5): 280-289.
- Chantome, A., Girault, A., Potier, M., Collin, C., Vaudin, P., Pages, J. C., Vandier, C., Joulin, V.** (2009). KCa2.3 channel-dependent hyperpolarization increases melanoma cell motility. *Exp Cell Res* **315**(20): 3620-3630.
- Chantome, A., Potier-Cartereau, M., Clarysse, L., Fromont, G., Marionneau-Lambot, S., Gueguinou, M., Pages, J. C., Collin, C., Oullier, T., Girault, A., Arbion, F., Haelters, J. P., Jaffres, P. A., Pinault, M., Besson, P., Joulin, V., Bougnoux, P., Vandier, C.** (2013). Pivotal role of the lipid Raft SK3-Orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases. *Cancer Res* **73**(15): 4852-4861.
- Chen, J., Luan, Y., Yu, R., Zhang, Z., Zhang, J., Wang, W.** (2014). Transient receptor potential (TRP) channels, promising potential diagnostic and therapeutic tools for cancer. *Biosci Trends* **8**(1): 1-10.
- Chen, Y. F., Chiu, W. T., Chen, Y. T., Lin, P. Y., Huang, H. J., Chou, C. Y., Chang, H. C., Tang, M. J., Shen, M. R.** (2011). Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(37): 15225-15230.
- Clapham, D. E.** (2007). Calcium signaling. *Cell* **131**(6): 1047-1058.
- Coetzee, W. A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M. S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz de Miera, E., Rudy, B.** (1999). Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci* **868**: 233-285.
- Cruse, G., Duffy, S. M., Brightling, C. E., Bradding, P.** (2006). Functional KCa3.1 K⁺ channels are required for human lung mast cell migration. *Thorax* **61**(10): 880-885.
- Cruse, G., Singh, S. R., Duffy, S. M., Doe, C., Saunders, R., Brightling, C. E., Bradding, P.** (2011). Functional KCa3.1 K⁺ channels are required for human fibrocyte migration. *J Allergy Clin Immunol* **128**(6): 1303-1309 e1302.
- Cuddapah, V. A., Sontheimer, H.** (2011). Ion channels and transporters [corrected] in cancer. 2. Ion channels and the control of cancer cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* **301**(3): C541-549.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B. A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J. W., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Weber, B. L., Seigler, H. F., Darrow, T. L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C. J., Wooster, R., Stratton, M. R., Futreal, P. A.** (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**(6892): 949-954.
- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabo, I., Rizzuto, R.** (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**(7360): 336-340.
- DeCoursey, T. E., Chandy, K. G., Gupta, S., Cahalan, M. D.** (1984). Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* **307**(5950): 465-468.
- Denmeade, S. R., Isaacs, J. T.** (2005). The SERCA pump as a therapeutic target: making a "smart bomb" for prostate cancer. *Cancer Biol Ther* **4**(1): 14-22.
- Derler, I., Fritsch, R., Schindl, R., Romanin, C.** (2008). CRAC inhibitors: identification and potential. *Expert Opin Drug Discov* **3**(7): 787-800.
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetschner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., MacKinnon, R.** (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**(5360): 69-77.

- Duncan, L. M., Deeds, J., Cronin, F. E., Donovan, M., Sober, A. J., Kauffman, M., McCarthy, J. J. (2001). Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *J Clin Oncol* **19**(2): 568-576.
- Duncan, L. M., Deeds, J., Hunter, J., Shao, J., Holmgren, L. M., Woolf, E. A., Tepper, R. I., Shyjan, A. W. (1998). Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res* **58**(7): 1515-1520.
- Dushek, O., Mueller, S., Soubies, S., Depoil, D., Caramalho, I., Coombs, D., Valitutti, S. (2008). Effects of intracellular calcium and actin cytoskeleton on TCR mobility measured by fluorescence recovery. *PLoS One* **3**(12): e3913.
- Eberle, J., Spangler, B., Becker, J. C., Heinemann, S. H., Klein, C. A., Kunz, M., Kuphal, S., Langer, P., Mauch, C., Meierjohann, S., Paschen, A., Schadendorf, D., Scharl, M., Schitteck, B., Schönherr, R., Tuting, T., Zigrino, P., Bosserhoff, A. K. (2010). Multicentre study on standardisation of melanoma cell culture--an initiative of the German Melanoma Research Network. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**(2): 296-298.
- Enfissi, A., Prigent, S., Colosetti, P., Capiod, T. (2004). The blocking of capacitative calcium entry by 2-aminoethyl diphenylborate (2-APB) and carboxyamidotriazole (CAI) inhibits proliferation in Hep G2 and Huh-7 human hepatoma cells. *Cell Calcium* **36**(6): 459-467.
- Everaerts, W., Nilius, B., Owsianik, G. (2010). The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease. *Prog Biophys Mol Biol* **103**(1): 2-17.
- Everaerts, W., Zhen, X., Ghosh, D., Vriens, J., Gevaert, T., Gilbert, J. P., Hayward, N. J., McNamara, C. R., Xue, F., Moran, M. M., Strassmaier, T., Uyk, E., Owsianik, G., Vennekens, R., De Ridder, D., Nilius, B., Fanger, C. M., Voets, T. (2010). Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(44): 19084-19089.
- Fang, D., Setaluri, V. (2000). Expression and Up-regulation of alternatively spliced transcripts of melastatin, a melanoma metastasis-related gene, in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **279**(1): 53-61.
- Fanger, C. M., Ghanshani, S., Logsdon, N. J., Rauer, H., Kalman, K., Zhou, J., Beckingham, K., Chandy, K. G., Cahalan, M. D., Aiyar, J. (1999). Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *J Biol Chem* **274**(9): 5746-5754.
- Faouzi, M., Chopin, V., Ahidouch, A., Ouadid-Ahidouch, H. (2010). Intermediate Ca²⁺-sensitive K⁺ channels are necessary for prolactin-induced proliferation in breast cancer cells. *J Membr Biol* **234**(1): 47-56.
- Faouzi, M., Hague, F., Potier, M., Ahidouch, A., Sevestre, H., Ouadid-Ahidouch, H. (2011). Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *J Cell Physiol* **226**(2): 542-551.
- Faouzi, M., Kischel, P., Hague, F., Ahidouch, A., Benzerdjeb, N., Sevestre, H., Penner, R., Ouadid-Ahidouch, H. (2013). ORAI3 silencing alters cell proliferation and cell cycle progression via c-myc pathway in breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1833**(3): 752-760.
- Feldman, B., Fedida-Metula, S., Nita, J., Sekler, I., Fishman, D. (2010). Coupling of mitochondria to store-operated Ca(2+)-signaling sustains constitutive activation of protein kinase B/Akt and augments survival of malignant melanoma cells. *Cell Calcium* **47**(6): 525-537.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**(7090): 179-185.
- Fiorio Pla, A., Gkika, D. (2013). Emerging role of TRP channels in cell migration: from tumor vascularization to metastasis. *Front Physiol* **4**: 311.
- Fiorio Pla, A., Ong, H. L., Cheng, K. T., Brossa, A., Bussolati, B., Lockwich, T., Paria, B., Munaron, L., Ambudkar, I. S. (2012). TRPV4 mediates tumor-derived endothelial cell migration via arachidonic acid-activated actin remodeling. *Oncogene* **31**(2): 200-212.

- Flockhart, R. J., Armstrong, J. L., Reynolds, N. J., Lovat, P. E.** (2009). NFAT signalling is a novel target of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *Br J Cancer* **101**(8): 1448-1455.
- Friebel, K., Schönherr, R., Kinne, R. W., Kunisch, E.** (2014). Functional role of the KCa3.1 potassium channel in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients. *J Cell Physiol*(10.1002/jcp.24924).
- Gackiere, F., Warnier, M., Katsogiannou, M., Derouiche, S., Delcourt, P., Dewailly, E., Slomianny, C., Humez, S., Prevarskaya, N., Roudbaraki, M., Mariot, P.** (2013). Functional coupling between large-conductance potassium channels and Cav3.2 voltage-dependent calcium channels participates in prostate cancer cell growth. *Biol Open* **2**(9): 941-951.
- Gandini, S., Autier, P., Boniol, M.** (2011). Reviews on sun exposure and artificial light and melanoma. *Prog Biophys Mol Biol* **107**(3): 362-366.
- Gao, Y. D., Hanley, P. J., Rinne, S., Zuzarte, M., Daut, J.** (2010). Calcium-activated K(+) channel (K(Ca)3.1) activity during Ca(2+) store depletion and store-operated Ca(2+) entry in human macrophages. *Cell Calcium* **48**(1): 19-27.
- Garbe, C., Leiter, U.** (2009). Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol* **27**(1): 3-9.
- Gardos, G.** (1958). The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* **30**(3): 653-654.
- Goldstein, S. A., Bayliss, D. A., Kim, D., Lesage, F., Plant, L. D., Rajan, S.** (2005). International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**(4): 527-540.
- Goldstein, S. A., Wang, K. W., Ilan, N., Pausch, M. H.** (1998). Sequence and function of the two P domain potassium channels: implications of an emerging superfamily. *J Mol Med (Berl)* **76**(1): 13-20.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., Nairn, R.** (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**(1): 59-74.
- Gray, L. S., Macdonald, T. L.** (2006). The pharmacology and regulation of T type calcium channels: new opportunities for unique therapeutics for cancer. *Cell Calcium* **40**(2): 115-120.
- Grissmer, S., Nguyen, A. N., Cahalan, M. D.** (1993). Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* **102**(4): 601-630.
- Gross, S. A., Wissenbach, U., Philipp, S. E., Freichel, M., Cavalie, A., Flockerzi, V.** (2007). Murine ORAI2 splice variants form functional Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels. *J Biol Chem* **282**(27): 19375-19384.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y.** (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**(6): 3440-3450.
- Gueguinou, M., Chantome, A., Fromont, G., Bougnoux, P., Vandier, C., Potier-Cartereau, M.** (2014). KCa and Ca channels: The complex thought. *Biochim Biophys Acta*.
- Guo, H., Carlson, J. A., Slominski, A.** (2012). Role of TRPM in melanocytes and melanoma. *Exp Dermatol* **21**(9): 650-654.
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stuhmer, W., Wang, X.** (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**(4): 473-508.
- Gwack, Y., Srikanth, S., Feske, S., Cruz-Guilloty, F., Oh-hora, M., Neems, D. S., Hogan, P. G., Rao, A.** (2007). Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *J Biol Chem* **282**(22): 16232-16243.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F. J.** (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**(2): 85-100.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A.** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**(5): 646-674.

- Hemmerlein, B., Weseloh, R. M., Mello de Queiroz, F., Knotgen, H., Sanchez, A., Rubio, M. E., Martin, S., Schliephacke, T., Jenke, M., Heinz Joachim, R., Stuhmer, W., Pardo, L. A. (2006). Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Mol Cancer* 5: 41.
- Hoffmann, E. K., Dunham, P. B. (1995). Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation. *Int Rev Cytol* 161: 173-262.
- Hogan, P. G., Lewis, R. S., Rao, A. (2010). Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol* 28: 491-533.
- Hoth, M., Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355(6358): 353-356.
- Hoth, M., Penner, R. (1993). Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol* 465: 359-386.
- Huang, X., Jan, L. Y. (2014). Targeting potassium channels in cancer. *J Cell Biol* 206(2): 151-162.
- Ishii, T. M., Silvia, C., Hirschberg, B., Bond, C. T., Adelman, J. P., Maylie, J. (1997). A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(21): 11651-11656.
- Ishiuchi, S., Tsuzuki, K., Yoshida, Y., Yamada, N., Hagimura, N., Okado, H., Miwa, A., Kurihara, H., Nakazato, Y., Tamura, M., Sasaki, T., Ozawa, S. (2002). Blockage of Ca(2+)-permeable AMPA receptors suppresses migration and induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Nat Med* 8(9): 971-978.
- Itoh, Y., Hatano, N., Hayashi, H., Onozaki, K., Miyazawa, K., Muraki, K. (2009). An environmental sensor, TRPV4 is a novel regulator of intracellular Ca²⁺ in human synoviocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 297(5): C1082-1090.
- Jairaman, A., Prakriya, M. (2013). Molecular pharmacology of store-operated CRAC channels. *Channels (Austin)* 7(5): 402-414.
- Ji, Z., Flaherty, K. T., Tsao, H. (2010). Molecular therapeutic approaches to melanoma. *Mol Aspects Med* 31(2): 194-204.
- Ji, Z., Flaherty, K. T., Tsao, H. (2012). Targeting the RAS pathway in melanoma. *Trends Mol Med* 18(1): 27-35.
- Jin, M., Berrouit, J., Chen, L., O'Neil, R. G. (2012). Hypotonicity-induced TRPV4 function in renal collecting duct cells: modulation by progressive cross-talk with Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Cell Calcium* 51(2): 131-139.
- Jin, M., Wu, Z., Chen, L., Jaimes, J., Collins, D., Walters, E. T., O'Neil, R. G. (2011). Determinants of TRPV4 activity following selective activation by small molecule agonist GSK1016790A. *PLoS One* 6(2): e16713.
- Joiner, W. J., Wang, L. Y., Tang, M. D., Kaczmarek, L. K. (1997). hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 11013-11018.
- Jurman, M. E., Boland, L. M., Liu, Y., Yellen, G. (1994). Visual identification of individual transfected cells for electrophysiology using antibody-coated beads. *Biotechniques* 17(5): 876-881.
- Kahl, C. R., Means, A. R. (2003). Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev* 24(6): 719-736.
- Karasarides, M., Chiloeches, A., Hayward, R., Niculescu-Duvaz, D., Scanlon, I., Friedlos, F., Ogilvie, L., Hedley, D., Martin, J., Marshall, C. J., Springer, C. J., Marais, R. (2004). B-Raf is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene* 23(37): 6292-6298.
- Kijporonyongpan, T., Sereemasapun, A., Chanchao, C. (2014). Dose-dependent cytotoxic effects of menthol on human malignant melanoma A-375 cells: correlation with TRPM8 transcript expression. *Asian Pac J Cancer Prev* 15(4): 1551-1556.
- Klausen, T. K., Pagani, A., Minassi, A., Ech-Chahad, A., Prenen, J., Owsianik, G., Hoffmann, E. K., Pedersen, S. F., Appendino, G., Nilius, B. (2009). Modulation of the transient

- receptor potential vanilloid channel TRPV4 by 4alpha-phorbol esters: a structure-activity study. *J Med Chem* **52**(9): 2933-2939.
- Koch, S. E., Gao, X., Haar, L., Jiang, M., Lasko, V. M., Robbins, N., Cai, W., Brokamp, C., Varma, P., Tranter, M., Liu, Y., Ren, X., Lorenz, J. N., Wang, H. S., Jones, W. K., Rubinstein, J.** (2012). Probenecid: novel use as a non-injurious positive inotrope acting via cardiac TRPV2 stimulation. *J Mol Cell Cardiol* **53**(1): 134-144.
- Kochukov, M. Y., McNearney, T. A., Fu, Y., Westlund, K. N.** (2006). Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**(3): C424-432.
- Köhler, M., Hirschberg, B., Bond, C. T., Kinzie, J. M., Marrion, N. V., Maylie, J., Adelman, J. P.** (1996). Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* **273**(5282): 1709-1714.
- Koschny, R., Walczak, H., Ganten, T. M.** (2007). The promise of TRAIL--potential and risks of a novel anticancer therapy. *J Mol Med (Berl)* **85**(9): 923-935.
- Kubo, Y., Adelman, J. P., Clapham, D. E., Jan, L. Y., Karschin, A., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Nichols, C. G., Seino, S., Vandenberg, C. A.** (2005). International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**(4): 509-526.
- Kunzelmann, K.** (2005). Ion channels and cancer. *J Membr Biol* **205**(3): 159-173.
- Kuras, Z., Yun, Y. H., Chimote, A. A., Neumeier, L., Conforti, L.** (2012). KCa3.1 and TRPM7 channels at the uropod regulate migration of activated human T cells. *PLoS One* **7**(8): e43859.
- Kuzhikandathil, E. V., Oxford, G. S.** (2000). Dominant-negative mutants identify a role for GIRK channels in D3 dopamine receptor-mediated regulation of spontaneous secretory activity. *J Gen Physiol* **115**(6): 697-706.
- Lallet-Daher, H., Roudbaraki, M., Bavencoffe, A., Mariot, P., Gackiere, F., Bidaux, G., Urbain, R., Gosset, P., Delcourt, P., Fleurisse, L., Slomianny, C., Dewailly, E., Mauroy, B., Bonnal, J. L., Skryma, R., Prevarskaya, N.** (2009). Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (IKCa1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry. *Oncogene* **28**(15): 1792-1806.
- Lee, J. M., Davis, F. M., Roberts-Thomson, S. J., Monteith, G. R.** (2011). Ion channels and transporters in cancer. 4. Remodeling of Ca(2+) signaling in tumorigenesis: role of Ca(2+) transport. *Am J Physiol Cell Physiol* **301**(5): C969-976.
- Lehen'kyi, V., Flourakis, M., Skryma, R., Prevarskaya, N.** (2007). TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* **26**(52): 7380-7385.
- Lewis, R. S.** (2011). Store-operated calcium channels: new perspectives on mechanism and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(12).
- Li, X., Zhou, L., Feng, Y. H., Abdul-Karim, F. W., Gorodeski, G. I.** (2006). The P2X7 receptor: a novel biomarker of uterine epithelial cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**(10): 1906-1913.
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr., Meyer, T.** (2005). STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol* **15**(13): 1235-1241.
- Logsdon, N. J., Kang, J., Togo, J. A., Christian, E. P., Aiyar, J.** (1997). A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J Biol Chem* **272**(52): 32723-32726.
- Luo, G., Cunningham, M., Kim, S., Burn, T., Lin, J., Sinz, M., Hamilton, G., Rizzo, C., Jolley, S., Gilbert, D., Downey, A., Mudra, D., Graham, R., Carroll, K., Xie, J., Madan, A., Parkinson, A., Christ, D., Selling, B., LeCluyse, E., Gan, L. S.** (2002). CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **30**(7): 795-804.

- MacKinnon, R., Cohen, S. L., Kuo, A., Lee, A., Chait, B. T.** (1998). Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science* **280**(5360): 106-109.
- Mancini, M., Toker, A.** (2009). NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **9**(11): 810-820.
- McAndrew, D., Grice, D. M., Peters, A. A., Davis, F. M., Stewart, T., Rice, M., Smart, C. E., Brown, M. A., Kenny, P. A., Roberts-Thomson, S. J., Monteith, G. R.** (2011). ORAI1-mediated calcium influx in lactation and in breast cancer. *Mol Cancer Ther* **10**(3): 448-460.
- McNamara, F. N., Randall, A., Gunthorpe, M. J.** (2005). Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). *Br J Pharmacol* **144**(6): 781-790.
- McNeill, M. S., Paulsen, J., Bonde, G., Burnight, E., Hsu, M. Y., Cornell, R. A.** (2007). Cell death of melanophores in zebrafish *trpm7* mutant embryos depends on melanin synthesis. *J Invest Dermatol* **127**(8): 2020-2030.
- Meera, P., Wallner, M., Song, M., Toro, L.** (1997). Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 14066-14071.
- Meyer, R., Schönherr, R., Gavrilo-Ruch, O., Wohlrab, W., Heinemann, S. H.** (1999). Identification of ether a go-go and calcium-activated potassium channels in human melanoma cells. *J Membr Biol* **171**(2): 107-115.
- Millership, J. E., Devor, D. C., Hamilton, K. L., Balut, C. M., Bruce, J. I., Fearon, I. M.** (2011). Calcium-activated K⁺ channels increase cell proliferation independent of K⁺ conductance. *Am J Physiol Cell Physiol* **300**(4): C792-802.
- Monteith, G. R., Davis, F. M., Roberts-Thomson, S. J.** (2012). Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences. *J Biol Chem* **287**(38): 31666-31673.
- Monteith, G. R., McAndrew, D., Faddy, H. M., Roberts-Thomson, S. J.** (2007). Calcium and cancer: targeting Ca²⁺ transport. *Nat Rev Cancer* **7**(7): 519-530.
- Montell, C.** (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **2005**(272): re3.
- Motiani, R. K., Hyzinski-Garcia, M. C., Zhang, X., Henkel, M. M., Abdullaev, I. F., Kuo, Y. H., Matrougui, K., Mongin, A. A., Trebak, M.** (2013). STIM1 and Orail1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. *Pflugers Arch* **465**(9): 1249-1260.
- Neher, E.** (1989). Combined fura-2 and patch clamp measurements in rat peritoneal mast cells. *Neuromuscular Junction* **5**: 65-76.
- Neher, E.** (1995). The use of fura-2 for estimating Ca buffers and Ca fluxes. *Neuropharmacology* **34**(11): 1423-1442.
- O'Neil, R. G., Heller, S.** (2005). The mechanosensitive nature of TRPV channels. *Pflugers Arch* **451**(1): 193-203.
- Oertner, T. G., Matus, A.** (2005). Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. *Cell Calcium* **37**(5): 477-482.
- Omholt, K., Platz, A., Kanter, L., Ringborg, U., Hansson, J.** (2003). NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res* **9**(17): 6483-6488.
- Orfanelli, U., Wenke, A. K., Doglioni, C., Russo, V., Bosserhoff, A. K., Lavorgna, G.** (2008). Identification of novel sense and antisense transcription at the TRPM2 locus in cancer. *Cell Res* **18**(11): 1128-1140.
- Ouadid-Ahidouch, H., Ahidouch, A.** (2008). K⁺ channel expression in human breast cancer cells: involvement in cell cycle regulation and carcinogenesis. *J Membr Biol* **221**(1): 1-6.
- Ouadid-Ahidouch, H., Ahidouch, A.** (2013). K(+) channels and cell cycle progression in tumor cells. *Front Physiol* **4**: 220.
- Ouadid-Ahidouch, H., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Ahidouch, A., Joury, N., Prevarskaya, N.** (2004). Functional and molecular identification of intermediate-conductance Ca(2+)-

- activated K(+) channels in breast cancer cells: association with cell cycle progression. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**(1): C125-134.
- Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T., Nilius, B.** (2006). Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol* **68**: 685-717.
- Panka, D. J., Wang, W., Atkins, M. B., Mier, J. W.** (2006). The Raf inhibitor BAY 43-9006 (Sorafenib) induces caspase-independent apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res* **66**(3): 1611-1619.
- Panner, A., Wurster, R. D.** (2006). T-type calcium channels and tumor proliferation. *Cell Calcium* **40**(2): 253-259.
- Pardo, L. A., Bruggemann, A., Camacho, J., Stühmer, W.** (1998). Cell cycle-related changes in the conducting properties of r-eag K⁺ channels. *J Cell Biol* **143**(3): 767-775.
- Pardo, L. A., del Camino, D., Sanchez, A., Alves, F., Bruggemann, A., Beckh, S., Stühmer, W.** (1999). Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J* **18**(20): 5540-5547.
- Pardo, L. A., Stühmer, W.** (2014). The roles of K(+) channels in cancer. *Nat Rev Cancer* **14**(1): 39-48.
- Parekh, A. B., Penner, R.** (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* **77**(4): 901-930.
- Parkash, J., Asotra, K.** (2010). Calcium wave signaling in cancer cells. *Life Sci* **87**(19-22): 587-595.
- Peggs, K. S., Quezada, S. A., Korman, A. J., Allison, J. P.** (2006). Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* **18**(2): 206-213.
- Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Safrina, O., Parker, I., Cahalan, M. D.** (2008). The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* **456**(7218): 116-120.
- Pingle, S. C., Matta, J. A., Ahern, G. P.** (2007). Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. *Handb Exp Pharmacol*(179): 155-171.
- Pinton, P., Rizzuto, R.** (2006). Bcl-2 and Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ* **13**(8): 1409-1418.
- Poser, I., Tatzel, J., Kuphal, S., Bosserhoff, A. K.** (2004). Functional role of MIA in melanocytes and early development of melanoma. *Oncogene* **23**(36): 6115-6124.
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., Hogan, P. G.** (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* **443**(7108): 230-233.
- Prakriya, M., Lewis, R. S.** (2001). Potentiation and inhibition of Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels by 2-aminoethyldiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors. *J Physiol* **536**(Pt 1): 3-19.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., Shuba, Y.** (2011). Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat Rev Cancer* **11**(8): 609-618.
- Prevarskaya, N., Zhang, L., Barritt, G.** (2007). TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1772**(8): 937-946.
- Putney, J. W., Jr.** (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**(1): 1-12.
- Putney, J. W., Jr.** (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* **11**(10): 611-624.
- Putney, J. W., Jr.** (2005). Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *J Cell Biol* **169**(3): 381-382.
- Qian, X., Francis, M., Kohler, R., Solodushko, V., Lin, M., Taylor, M. S.** (2014). Positive feedback regulation of agonist-stimulated endothelial Ca²⁺ dynamics by KCa3.1 channels in mouse mesenteric arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**(1): 127-135.
- Quast, S. A., Berger, A., Buttstadt, N., Friebe, K., Schonherr, R., Eberle, J.** (2012). General Sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by the potassium channel inhibitor TRAM-34 depends on release of SMAC. *PLoS One* **7**(6): e39290.
- Rasmussen, C. D., Means, A. R.** (1989). Calmodulin is required for cell-cycle progression during G1 and mitosis. *EMBO J* **8**(1): 73-82.
- Rizzuto, R., Pozzan, T.** (2006). Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* **86**(1): 369-408.

- Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O'Day, S., M, D. J., Garbe, C., Lebbe, C., Baurain, J. F., Testori, A., Grob, J. J., Davidson, N., Richards, J., Maio, M., Hauschild, A., Miller, W. H., Jr., Gascon, P., Lotem, M., Harmankaya, K., Ibrahim, R., Francis, S., Chen, T. T., Humphrey, R., Hoos, A., Wolchok, J. D. (2011). Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* **364**(26): 2517-2526.
- Roberts-Thomson, S. J., Peters, A. A., Grice, D. M., Monteith, G. R. (2010). ORAI-mediated calcium entry: mechanism and roles, diseases and pharmacology. *Pharmacol Ther* **127**(2): 121-130.
- Roderick, H. L., Cook, S. J. (2008). Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer* **8**(5): 361-375.
- Rodriguez-Rasgado, J. A., Acuna-Macias, I., Camacho, J. (2012). Eag1 channels as potential cancer biomarkers. *Sensors (Basel)* **12**(5): 5986-5995.
- Roger, S., Potier, M., Vandier, C., Besson, P., Le Guennec, J. Y. (2006). Voltage-gated sodium channels: new targets in cancer therapy? *Curr Pharm Des* **12**(28): 3681-3695.
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., Velicelebi, G., Stauderman, K. A. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol* **169**(3): 435-445.
- Sachs, H. G., Stambrook, P. J., Ebert, J. D. (1974). Changes in membrane potential during the cell cycle. *Exp Cell Res* **83**(2): 362-366.
- Sambrook, J., Green, M. R. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santoni, G., Farfariello, V. (2011). TRP channels and cancer: new targets for diagnosis and chemotherapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **11**(1): 54-67.
- Schmidt, J., Friebe, K., Schonherr, R., Coppolino, M. G., Bosserhoff, A. K. (2010). Migration-associated secretion of melanoma inhibitory activity at the cell rear is supported by KCa3.1 potassium channels. *Cell Res* **20**(11): 1224-1238.
- Schönherr, R. (2005). Clinical relevance of ion channels for diagnosis and therapy of cancer. *J Membr Biol* **205**(3): 175-184.
- Schwab, A., Fabian, A., Hanley, P. J., Stock, C. (2012). Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiol Rev* **92**(4): 1865-1913.
- Schwab, A., Gabriel, K., Finsterwalder, F., Folprecht, G., Greger, R., Kramer, A., Oberleithner, H. (1995). Polarized ion transport during migration of transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Pflugers Arch* **430**(5): 802-807.
- Schwab, A., Reinhardt, J., Schneider, S. W., Gassner, B., Schuricht, B. (1999). K(+) channel-dependent migration of fibroblasts and human melanoma cells. *Cell Physiol Biochem* **9**(3): 126-132.
- Sciaccaluga, M., Fioretti, B., Catacuzzeno, L., Pagani, F., Bertollini, C., Rosito, M., Catalano, M., D'Alessandro, G., Santoro, A., Cantore, G., Ragozzino, D., Castigli, E., Franciolini, F., Limatola, C. (2010). CXCL12-induced glioblastoma cell migration requires intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activity. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**(1): C175-184.
- Sell, D. (2014). Untersuchungen zum Einfluss onkogener Signalwege auf die Expression des Ionenkanals TRPV4 in A375 Melanomzellen. Jena. Friedrich-Schiller-Universität Jena. Bachelorarbeit.
- Skopin, A., Shalygin, A., Vigont, V., Zimina, O., Glushankova, L., Mozhayeva, G. N., Kaznacheyeva, E. (2013). TRPC1 protein forms only one type of native store-operated channels in HEK293 cells. *Biochimie* **95**(2): 347-353.
- Skryma, R., Mariot, P., Bourhis, X. L., Coppenolle, F. V., Shuba, Y., Vanden Abeele, F., Legrand, G., Humez, S., Boilly, B., Prevarskaya, N. (2000). Store depletion and store-operated Ca²⁺ current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol* **527 Pt 1**: 71-83.

- Spitzner, M., Ousingsawat, J., Scheidt, K., Kunzelmann, K., Schreiber, R. (2007). Voltage-gated K⁺ channels support proliferation of colonic carcinoma cells. *FASEB J* **21**(1): 35-44.
- Srikanth, S., Ribalet, B., Gwack, Y. (2013). Regulation of CRAC channels by protein interactions and post-translational modification. *Channels (Austin)* **7**(5): 354-363.
- Stanisz, H., Saul, S., Muller, C. S., Kappl, R., Niemeyer, B. A., Vogt, T., Hoth, M., Roesch, A., Bogeski, I. (2014). Inverse regulation of melanoma growth and migration by Orai1/STIM2-dependent calcium entry. *Pigment Cell Melanoma Res* **27**(3): 442-453.
- Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G., Plant, T. D. (2000). OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* **2**(10): 695-702.
- Sullivan, R. J., Flaherty, K. (2013). MAP kinase signaling and inhibition in melanoma. *Oncogene* **32**(19): 2373-2379.
- Sun, J., Lu, F., He, H., Shen, J., Messina, J., Mathew, R., Wang, D., Sarnaik, A. A., Chang, W. C., Kim, M., Cheng, H., Yang, S. (2014). STIM1- and Orai1-mediated Ca²⁺ oscillation orchestrates invadopodium formation and melanoma invasion. *J Cell Biol*.
- Suzuki, S., Kurata, N., Nishimura, Y., Yasuhara, H., Satoh, T. (2000). Effects of imidazole antimycotics on the liver microsomal cytochrome P450 isoforms in rats: comparison of in vitro and ex vivo studies. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **25**(2): 121-126.
- Tajima, N., Schönherr, K., Niedling, S., Kaatz, M., Kanno, H., Schönherr, R., Heinemann, S. H. (2006). Ca²⁺-activated K⁺ channels in human melanoma cells are up-regulated by hypoxia involving hypoxia-inducible factor-1 α and the von Hippel-Lindau protein. *J Physiol* **571**(Pt 2): 349-359.
- Takahashi, A., Yamaguchi, H., Miyamoto, H. (1993). Change in K⁺ current of HeLa cells with progression of the cell cycle studied by patch-clamp technique. *Am J Physiol* **265**(2 Pt 1): C328-336.
- Takemura, H., Hughes, A. R., Thastrup, O., Putney, J. W., Jr. (1989). Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J Biol Chem* **264**(21): 12266-12271.
- Tao, R., Lau, C. P., Tse, H. F., Li, G. R. (2008). Regulation of cell proliferation by intermediate-conductance Ca²⁺-activated potassium and volume-sensitive chloride channels in mouse mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**(5): C1409-1416.
- Thebault, S., Flourakis, M., Vanoverberghe, K., Vandermoere, F., Roudbaraki, M., Lehen'kyi, V., Slomianny, C., Beck, B., Mariot, P., Bonnal, J. L., Mauroy, B., Shuba, Y., Capiod, T., Skryma, R., Prevarskaya, N. (2006). Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res* **66**(4): 2038-2047.
- Thebault, S., Lemonnier, L., Bidaux, G., Flourakis, M., Bavencoffe, A., Gordienko, D., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Panchin, Y., Shuba, Y., Skryma, R., Prevarskaya, N. (2005). Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* **280**(47): 39423-39435.
- Thorneloe, K. S., Sulpizio, A. C., Lin, Z., Figueroa, D. J., Clouse, A. K., McCafferty, G. P., Chendrimada, T. P., Lashinger, E. S., Gordon, E., Evans, L., Misajet, B. A., Demarini, D. J., Nation, J. H., Casillas, L. N., Marquis, R. W., Votta, B. J., Sheardown, S. A., Xu, X., Brooks, D. P., Laping, N. J., Westfall, T. D. (2008). N-((1S)-1-[[4-((2S)-2-[[[(2,4-dichlorophenyl)sulfonyl]amino]-3-hydroxypropanoyl]-1-piperazinyl]carbonyl]-3-methylbutyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a novel and potent transient receptor potential vanilloid 4 channel agonist induces urinary bladder contraction and hyperactivity: Part I. *J Pharmacol Exp Ther* **326**(2): 432-442.
- Urrego, D., Tomczak, A. P., Zahed, F., Stuhmer, W., Pardo, L. A. (2014). Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**(1638): 20130094.

- Vanden Abeele, F., Lemonnier, L., Thebault, S., Lepage, G., Parys, J. B., Shuba, Y., Skryma, R., Prevarskaya, N. (2004). Two types of store-operated Ca^{2+} channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* **279**(29): 30326-30337.
- Vanden Abeele, F., Shuba, Y., Roudbaraki, M., Lemonnier, L., Vanoverberghe, K., Mariot, P., Skryma, R., Prevarskaya, N. (2003). Store-operated Ca^{2+} channels in prostate cancer epithelial cells: function, regulation, and role in carcinogenesis. *Cell Calcium* **33**(5-6): 357-373.
- Venkatachalam, K., Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem* **76**: 387-417.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., Kinet, J. P. (2006). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca^{2+} entry. *Science* **312**(5777): 1220-1223.
- Vriens, J., Appendino, G., Nilius, B. (2009). Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol* **75**(6): 1262-1279.
- Vultur, A., Villanueva, J., Herlyn, M. (2011). Targeting BRAF in advanced melanoma: a first step toward manageable disease. *Clin Cancer Res* **17**(7): 1658-1663.
- Wang, J. Y., Sun, J., Huang, M. Y., Wang, Y. S., Hou, M. F., Sun, Y., He, H., Krishna, N., Chiu, S. J., Lin, S., Yang, S., Chang, W. C. (2014). STIM1 overexpression promotes colorectal cancer progression, cell motility and COX-2 expression. *Oncogene*.
- Wang, S. P., Wang, J. A., Luo, R. H., Cui, W. Y., Wang, H. (2008). Potassium channel currents in rat mesenchymal stem cells and their possible roles in cell proliferation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **35**(9): 1077-1084.
- Wang, Z. H., Shen, B., Yao, H. L., Jia, Y. C., Ren, J., Feng, Y. J., Wang, Y. Z. (2007). Blockage of intermediate-conductance- Ca^{2+} -activated K^{+} channels inhibits progression of human endometrial cancer. *Oncogene* **26**(35): 5107-5114.
- Watanabe, H., Davis, J. B., Smart, D., Jerman, J. C., Smith, G. D., Hayes, P., Vriens, J., Cairns, W., Wissenbach, U., Prenen, J., Flockerzi, V., Droogmans, G., Benham, C. D., Nilius, B. (2002). Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem* **277**(16): 13569-13577.
- Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., Nilius, B. (2003). Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* **424**(6947): 434-438.
- Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S. H., Benham, C. D., Droogmans, G., Nilius, B. (2002). Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* **277**(49): 47044-47051.
- Weaver, A. K., Liu, X., Sontheimer, H. (2004). Role for calcium-activated potassium channels (BK) in growth control of human malignant glioma cells. *J Neurosci Res* **78**(2): 224-234.
- Wei, A. D., Gutman, G. A., Aldrich, R., Chandy, K. G., Grissmer, S., Wulff, H. (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**(4): 463-472.
- Wes, P. D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G., Montell, C. (1995). TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21): 9652-9656.
- Williams, S., Bateman, A., O'Kelly, I. (2013). Altered expression of two-pore domain potassium (K2P) channels in cancer. *PLoS One* **8**(10): e74589.
- Wissenbach, U., Philipp, S. E., Gross, S. A., Cavalie, A., Flockerzi, V. (2007). Primary structure, chromosomal localization and expression in immune cells of the murine ORAI and STIM genes. *Cell Calcium* **42**(4-5): 439-446.
- Wonderlin, W. F., Woodfork, K. A., Strobl, J. S. (1995). Changes in membrane potential during the progression of MCF-7 human mammary tumor cells through the cell cycle. *J Cell Physiol* **165**(1): 177-185.
- Wulff, H., Castle, N. A. (2010). Therapeutic potential of $\text{KCa}3.1$ blockers: recent advances and promising trends. *Expert Rev Clin Pharmacol* **3**(3): 385-396.

- Wulff, H., Gutman, G. A., Cahalan, M. D., Chandy, K. G.** (2001). Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1. *J Biol Chem* **276**(34): 32040-32045.
- Wulff, H., Miller, M. J., Hansel, W., Grissmer, S., Cahalan, M. D., Chandy, K. G.** (2000). Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 8151-8156.
- Xia, X. M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J. E., Ishii, T., Hirschberg, B., Bond, C. T., Lutsenko, S., Maylie, J., Adelman, J. P.** (1998). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* **395**(6701): 503-507.
- Xu, H., Blair, N. T., Clapham, D. E.** (2005). Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci* **25**(39): 8924-8937.
- Yamamura, H., Ugawa, S., Ueda, T., Morita, A., Shimada, S.** (2008). TRPM8 activation suppresses cellular viability in human melanoma. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**(2): C296-301.
- Yang, M., Brackenbury, W. J.** (2013). Membrane potential and cancer progression. *Front Physiol* **4**: 185.
- Yang, S., Zhang, J. J., Huang, X. Y.** (2009). Orail and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell* **15**(2): 124-134.
- Yang, X. W., Liu, J. W., Zhang, R. C., Yin, Q., Shen, W. Z., Yi, J. L.** (2013). Inhibitory effects of blockage of intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels on proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **33**(1): 86-89.
- Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O., Cahalan, M. D.** (2006). Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* **443**(7108): 226-229.
- Zhang, L., Barritt, G. J.** (2004). Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca^{2+} channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Res* **64**(22): 8365-8373.
- Zhang, S. L., Kozak, J. A., Jiang, W., Yeromin, A. V., Chen, J., Yu, Y., Penna, A., Shen, W., Chi, V., Cahalan, M. D.** (2008). Store-dependent and -independent modes regulating Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activity of human Orail and Orai3. *J Biol Chem* **283**(25): 17662-17671.
- Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stauderman, K. A., Cahalan, M. D.** (2005). STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. *Nature* **437**(7060): 902-905.
- Zhao, L., Sullivan, M. N., Chase, M., Gonzales, A. L., Earley, S.** (2014). Calcineurin/nuclear factor of activated T cells-coupled vanilloid transient receptor potential channel 4 Ca^{2+} sparklets stimulate airway smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **50**(6): 1064-1075.
- Zweifach, A., Lewis, R. S.** (1993). Mitogen-regulated Ca^{2+} current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13): 6295-6299.
- Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D., Hogestatt, E. D.** (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**(6743): 452-457.

Verwendete Broschüren:

Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). Berlin. 2013.

Verwendete Internet-Ressourcen:

GLOBOCAN 2012:	globocan.iarc.fr/
Life Technologies GmbH:	www.lifetechnologies.com
WEBMAXC:	http://web.stanford.edu/~cpatton/webmaxcS.htm

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan H. Heinemann für die Bereitstellung dieses spannenden Themas, die exzellenten Arbeitsbedingungen und die konstruktive Kritik an meiner Arbeit. Seine Unterstützung bei allen wissenschaftlichen und experimentellen Fragen war stets von hohem Wert für mich.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei PD Dr. Roland Schönherr für die umfangreiche Betreuung bedanken. Er war jederzeit bereit, die kleinen und großen Probleme, die mitunter über fachliche Themen hinausgingen, zu diskutieren. Er gab meiner Arbeit wertvolle Impulse und hat mich stets motiviert, wenn kein Vorwärtsskommen möglich schien.

Im Besonderen möchte ich mich bei Prof. Dr. Anja K. Bosserhoff, PD Dr. Silke Kuphal und Dr. Jennifer Schmidt sowie Prof. Dr. Raimund W. Kinne und Dr. Elke Kunisch für die produktive, reibungslose und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Ein großer Dank geht an die Deutsche Krebshilfe, die dieses Projekt finanziell möglich gemacht und zu einer inspirierenden Zusammenarbeit mit den Forschern des „*Melanoma Research Networks*“ geführt hat. Ein weiterer Dank geht an die Friedrich-Schiller-Universität Jena, die mir mit dem ProChance 2011-Stipendium die Kongressteilnahme in Marrakesch ermöglicht und damit einen entscheidenden, wegweisenden Beitrag zu meiner Arbeit geleistet hat.

Weiterhin möchte ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die erheiternden Stunden inner- und außerhalb des Labors bedanken. Mein Dank gilt vor allem Maria, Rabab, Nicole, Oli, Jana, Nadine, Martin, René und Johannes. Ein besonderer Dank gebührt unseren technischen Assistentinnen und „guten Feen“ Anja Kessler und Angela Roßner für ihre fleißige Unterstützung im Laboralltag und das unermüdliche Zubereiten meines „Lieblingspuffers“. Weiterhin möchte ich Dr. Enrico Leipold und Dr. Guido Gessner für die Einarbeitung in IgorPro und die Hilfe bei der Erstellung von Makros danken. Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Rayk für das kritische Lesen meiner Arbeit, aber vor allem für seinen Beistand in schweren Zeiten und seinen unverbesserlichen Humor bedanken.

Ein großes Dankeschön geht auch an die Kollegen von Jena Bioscience, insbesondere an Dr. Mathias Grün und Dr. Thomas Waldbach, Bettina und Bürk für die freundliche und familiäre Aufnahme in ihrer Firma.

Bei meinen Freunden möchte ich mich bedanken für ihre moralische Unterstützung. Durch sie konnte ich neue Energie und Kraft schöpfen. Im Besonderen danke ich Gianna, Nikolaj, Katrin und Sina für ihre Gesellschaft beim Schreiben und dass sie mir immer Mut gemacht haben.

Meiner Familie möchte ich für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Liebe danken. Bedanken möchte ich mich auch für die stetige finanzielle Unterstützung während meiner universitären Ausbildung. Ein großer Dank gilt meinem verstorbenen Vater, der mir immer gezeigt hat, wie stolz er auf mich ist. Er war ein Grund, dass ich nie aufgegeben habe. Ich denke, dass ihn diese Arbeit mit Glück und Stolz erfüllt hätte.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre, dass

- mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe. Alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen sind in der Arbeit an entsprechender Stelle angegeben.
- Ich diese Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.
- Ich bei keiner anderen Hochschule eine Dissertation eingereicht habe.

Jena, Februar 2015

Kristin Friebe

Publikationstätigkeit

Artikel in wissenschaftlichen Fachzeitschriften

Friebel, K., Schönherr, R., Kinne, R.W., Kunisch, E. (2014). Functional role of the KCa3.1 potassium channel in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients. *J Cell Physiol*. doi: 10.1002/jcp.24924.

Quast, S., Berger, A., Buttstädt, N., Friebel, K., Schönherr, R., Eberle, J. (2012). General Sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by the potassium channel inhibitor TRAM-34 depends on release of SMAC. *PLoS One* **7**(6): e39290.

Nafee, N., Schneider, M., Friebel, K., Dong, M., Schaefer, U.F., Mürdter, T.E., Lehr, C.M. (2012). Treatment of lung cancer via telomerase inhibition: self-assembled nanoplexes versus polymeric nanoparticles as vectors for 2'-O-Methyl-RNA. *Eur J Pharm Biopharm* **80**(3): 478-489.

Schmidt, J., Friebel, K., Schönherr, R., Coppolino, M.G., Bosserhoff, A.K. (2010). Migration-associated secretion of melanoma inhibitory activity at the cell rear is supported by KCa3.1 potassium channels. *Cell Res* **20**(11): 1224-1238.

Vorträge

Friebel, K. (2010). Potassium channels and calcium homeostasis in melanoma cells. International Life Sciences Students' Conference, Nijmegen, Niederlande.

Friebel, K., Buttstädt, N., Schönherr, R., Heinemann, S.H. (2011). KCa3.1 channels and Ca^{2+} homeostasis in malignant melanoma. 1st International Meeting on Ion Channel Signaling Mechanisms: from basic science to clinical application, Marrakesch, Marokko.

Posterpräsentationen

Buttstädt, N., Friebel, K., Quast, A., Eberle, J., Heinemann, S.H., Schönherr, R. (2010). TRAM-34, a selective inhibitor of the calcium-activated potassium channel IKCa1 has multiple effects on melanoma cells. 33rd Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, Regensburg

Buttstädt, N., Friebel, K., Heinemann, S.H., Schönherr, R., Adam, C., Wulff, H., Becker, J.C. (2011). The intermediate-conductance Ca^{2+} -activated potassium channel KCa3.1 as novel therapeutic target in malignant melanoma. 21. Deutscher Hautkrebs-Kongress und ADO Jahrestagung, Weimar.

Friebel, K., Buttstädt, N., Schönherr, R., Heinemann, S.H. (2011). The intermediate-conductance Ca^{2+} -activated potassium channel KCa3.1 modulates intracellular calcium homeostasis in melanoma cells. 1st International Meeting on Ion Channel Signaling Mechanisms: from basic science to clinical application, Marrakesch, Marokko.

Kongressteilnahmen

33rd Annual Meeting of the German Society for Cell Biology.

10.-13.03.2010, Regensburg.

International Life Sciences Students' Conference

10.-14.11.2010, Nijmegen, Niederlande.

21. Deutscher Hautkrebs-Kongress und ADO Jahrestagung.

15.-17.09.2011, Weimar.

1st International Meeting on Ion Channel Signaling Mechanisms: from basic science to clinical application.

30.10.-04.11.2011, Marrakesch, Marokko.